

Université de Montréal

Contribution à l'étude de la physiopathologie  
d'une forme d'angiooedème acquis :  
l'angiooedème induit par les oestrogènes

Par

Marlène Trépanier

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Sciences Pharmaceutiques

Mai 2006

© Marlène Trépanier, 2006





Direction des bibliothèques

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Contribution à l'étude de la physiopathologie  
d'une forme d'angiooedème acquis :  
l'angiooedème induit par les oestrogènes

Présenté par :  
Marlène Trépanier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

<u>Pierre Moreau</u>	:	Président Rapporteur
<u>Albert Adam</u>	:	Directeur de recherche
<u>Daniel Lamontagne</u>	:	Codirecteur de recherche
<u>Patrick Du Souich</u>	:	Membre

Mémoire accepté le : \_\_\_\_\_.

## Résumé

L'angiooedème (AO) en absence d'allergie représente encore un paradoxe médical. Cette réaction inflammatoire locale se manifeste sous forme d'enflures aux niveaux facial, laryngé, génital, intra abdominal ou encore aux extrémités comme les pieds et les mains. L'AO représente un danger pour la vie si sa localisation implique les voies respiratoires supérieures, principalement le larynx, pouvant provoquer l'asphyxie.

Il existe deux types d'AO : les formes héréditaires et les formes acquises. Le type héréditaire est dû à un déficit génétique de nature quantitative ou qualitative de l'inhibiteur de C1 (C1-INH) serpine dont le double rôle physiologique est de contrôler l'activation du complément et du système de contact du plasma. Les AO de nature acquise sont de trois types : associé à un désordre lymphoprolifératif avec consommation du C1INH, de nature médicamenteuse secondaire à la prise d'oestrogènes ou d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et enfin de nature idiopathique.

Notre projet de maîtrise s'inscrit dans le contexte des travaux du laboratoire consacrés aux rôles des kinines dans la physiopathologie des différents types d'AO. Nous avons étudié le rôle de ces dernières dans les AO acquis associés à la prise d'oestrogènes. Ainsi, nous avons défini le métabolisme des kinines dans des échantillons de plasma prélevés chez des patientes ayant présenté des épisodes d'AO lors de la prise de la pilule contraceptive. Pour ce faire, nous avons appliqué une méthodologie développée au laboratoire et nous avons complété cette approche par le dosage de différentes peptidases impliquées dans le métabolisme des kinines.

Ces investigations au niveau plasmatique ont été complétées par le dosage et la caractérisation des kinines dans des échantillons d'urine prélevés après un épisode aigu d'AO ainsi que dans l'urine d'un groupe témoin.

En parallèle, nous avons développé une approche par PCR en temps réel pour le dosage de l'ARNm de l'APN, la DPPIV et la kallibréine glandulaire dans les tissus oropharyngés, siège d'une forme mortelle d'AO.

Ainsi, malgré l'absence de données concluantes quant au métabolisme des kinines plasmatiques, leur excrétion urinaire ainsi que la régulation de certains constituants du système kallibréines-kinines, l'analyse de ces résultats permettra de mieux comprendre le rôle joué par les kinines dans la physiopathologie de l'AO et de poursuivre davantage la recherche dans ce domaine.

*Mots-clés:* angiooedème, kinines, oestrogènes, métabolisme

## Summary

The pathophysiology of angioedema (AE) is still poorly understood in the medical community. This local inflammatory reaction refers to an abrupt swelling of the face, larynx, genital parts, gastrointestinal tract, hands or feet. AE can be life-threatening if it occurs in the upper-airways, particularly at the larynx, where it can induce asphyxia.

There are actually two types of AE: hereditary AE (HAE) and acquired AE (AOE). The hereditary form is caused by inherited or acquired deficiencies of C1-inhibitor (C1-INH) that has biologic roles in the control of the complement activation and the contact system activation. The acquired form can be classified in three types: AE associated with a lymphoproliferative disorder, AE caused by medication such as estrogen treatment and angiotensin-converting enzyme inhibitors or idiopathic AE.

This study is a continuation of the previous works done at our laboratory that had the objective to understand the role of kinins in the physiopathology of AE, specifically the estrogen-dependent form. Therefore, we have defined the kinins metabolism in plasma samples collected from patients who had developed an AE on oral contraception treatment by using a method previously developed in our laboratory, completed by the activity measurement of the peptidases responsible of the kinins metabolism.

These plasma investigations have been completed by the characterisation of kinins in urine samples collected from patients who had developed an acute AE and compared with urine collected from a control group.

We have also developed a real-time PCR method for the assessment of the RNA expression of APN, DPPIV and glandular kallikrein in oropharyngeal tissues, implicated in the gravest clinical forms of AE.

Despite the non conclusive results related to the plasmatic kinins metabolism, their urinary excretion as well as the RNA expression of some of the kallikreins-kinins system components, this study will allow in a certain manner a better understanding of the role of kinins in the physiopathology of AE and to continue research studies in this medical domain.

*Keewords:* angioedema, kinins, estrogen, metabolism

## Table des matières

INTRODUCTION .....	1
I Le système kallibréines-kinines .....	1
1. Les kallibréines .....	3
1.1 Les kallibréines glandulaires .....	4
1.1.1 Caractéristiques générales .....	4
1.1.2 La kallibréine rénale .....	6
1.1.3 La kallibréine salivaire .....	7
1.2 La kallibréine plasmatique .....	8
2. Les kininogènes .....	8
3. Les kinines .....	10
4. Les récepteurs des kinines .....	11
5. Les systèmes kininoformateurs .....	13
5.1 Le système de contact du plasma .....	13
5.1.1 Le système du complément .....	14
5.1.2 Le système fibrinolytique .....	16
5.2 Le système kininoformateur au niveau des cellules endothéliales .....	17
6. Le métabolisme des kinines .....	17
6.1 Enzymes impliquées dans le métabolisme des kinines .....	18
6.1.1 L'enzyme de conversion de l'angiotensine I .....	18
6.1.2 L'aminopeptidase P .....	19
6.1.3 Les carboxypeptidases .....	20
6.1.4 L'endopeptidase neutre 24.11 .....	21
6.1.5 L'aminopeptidase N .....	22
6.1.6 Dipeptidyl peptidase IV .....	23
6.2 Métabolisme des kinines .....	24
6.2.1 Méthodes d'investigation .....	24
6.2.2 Métabolisme des kinines plasmatiques .....	25
6.2.3 Métabolisme des kinines tissulaires .....	26
6.2.4 Métabolisme des kinines urinaires .....	27
7. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine .....	27
7.1 Effets secondaires des iECAs .....	27

7.2	L'effet des iECAs sur l'expression des métalloprotéinases et des récepteurs des kinines au niveau oropharyngé .....	28
II	Les angioedèmes .....	29
1.	Définition.....	29
2.	Classification .....	30
2.1	L'angioedème héréditaire .....	30
2.2	L'angioedème acquis.....	31
2.2.1	L'angioedème associé à un désordre lymphoprolifératif avec consommation du C1-INH.....	32
2.2.2	L'angioedème associé à un désordre autoimmun.....	32
2.2.3	L'angioedème associé à la prise d'oestrogènes.....	32
2.2.4	L'angioedème associé à la prise d'iECA.....	34
2.2.5	L'angioedème idiopathique.....	35
	BUTS DU TRAVAIL.....	36
	MÉTHODOLOGIE .....	37
	Matériel et réactifs .....	37
I	Rôle des kinines dans les angioedèmes acquis induits par les oestrogènes .....	37
1.	Échantillons de plasma.....	37
1.1	Angioedème associé à la prise d'oestrogènes .....	37
1.2	Angioedème héréditaire de type I .....	38
2	Métabolisme des kinines exogènes .....	38
2.1	Incubation .....	38
2.2	Quantification des kinines .....	38
2.3	Calcul de la demi-vie des kinines.....	39
3	Dosage des métallopeptidases plasmatiques .....	39
3.1	Amino-peptidase P (APP).....	39
3.2	Enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA).....	40
3.3	Carboxypeptidase N (CPN) .....	40
3.4	Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) .....	41
3.5	Amino-peptidase N (APN).....	41
4.	Analyses statistiques .....	41



II	Analyse des kinines urinaires chez les patients ayant développé un épisode d'angiooedème de nature idiopathique .....	42
1.	Échantillons d'urine .....	42
2.	Purification des kinines urinaires par chromatographie hydrophobe.....	42
3.	Dosage des kinines urinaires .....	42
4.	Caractérisation des kinines immunoréactives par HPLC .....	43
III	Régulation de l'expression de certains constituants du système kallicroéines-kinines au niveau du tissu oropharyngé chez le porc .....	43
1.	Modèle animal .....	43
2.	Isolation de l'ARN des tissus .....	44
3.	Transcription inverse (RT) et Réaction de polymérase en chaîne en temps réel (RT-PCR) .....	44
4.	Quantification relative.....	46
	PRÉSENTATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS.....	47
I	Métabolisme des kinines dans les angiooedèmes chez des patientes ayant développé des crises d'AO associées à la prise de contraceptifs oraux .....	47
1.	Peptidases plasmatiques impliquées dans le métabolisme des kinines.....	47
2.	Demi-vies de dégradation de la BK et la des-Arg <sup>9</sup> -BK exogènes dans le plasma de patientes atteintes d'AO associé à la prise de contraceptifs oraux.....	48
3.	Comparaison des activités des peptidases plasmatiques et des t <sub>1/2</sub> de dégradation des kinines exogènes chez les femmes ayant développé des crises d'AO associé à un contraceptif à ces mêmes paramètres mesurés dans le plasma de femmes atteintes d'un angiooedème héréditaire (AOH).....	50
II	Mesure des kinines urinaires chez les patients ayant développé des crises d'angiooedème de nature idiopathique .....	53
1.	Dosage de la BK et la des-Arg <sup>9</sup> -BK immunoréactives dans l'urine de patients ayant développé des crises d'AO de nature idiopathique et dans l'urine d'un groupe témoin.....	53
2.	Caractérisation des kinines urinaires par chromatographie liquide à haute performance.....	54
III	Étude de l'expression génique de certains constituants du système kallicroéines-kinines au niveau du tissu oropharyngé chez le porc .....	56

1. Spécificité des amorces .....	56
2. Quantification relative de l'expression des différents gènes dans les tissus : comparaison entre les quatre groupes de porcs .....	57
DISCUSSION GÉNÉRALE .....	59
BIBLIOGRAPHIE .....	62

## Liste des figures

- Figure 1.** Représentation des 6 domaines du KHPM et leur fonction primaire.....10
- Figure 2.** Les récepteurs des kinines et leurs voies de signalisation.....12
- Figure 3.** Le système kallibréines-kinines et ses interactions avec les voies extrinsèque et intrinsèque de la coagulation et la voie de la fibrinolyse.....14
- Figure 4.** Vue d'ensemble des voies d'activation du complément : la voie classique, la voie alterne et la voie lectine.....16
- Figure 5.** Contribution relative des principales peptidases plasmatiques impliquées dans le métabolisme de la KD, la BK et la des-Arg<sup>9</sup>-BK.....25
- Figure 6.** Moyenne de l'activité enzymatique des différentes peptidases plasmatiques (ECA, CPN, DPPIV et APN) chez le groupe de femmes sous prise de contraceptifs oraux comparativement au groupe ayant cessé le médicament.....47
- Figure 7.** Moyenne de l'activité enzymatique de l'APP plasmatique des femmes ayant développé des crises d'AO lorsque recevant un contraceptif oral.....48
- Figure 8.** Moyenne des t<sub>1/2</sub> de dégradation de la BK exogène ajoutée au plasma de patientes ayant présenté des épisodes d'AO suite à la prise de contraceptifs oraux.....49

- Figure 9.** Moyenne des  $t_{1/2}$  de dégradation de la des-Arg<sup>9</sup>-BK exogène incubée dans le plasma de patientes atteintes d'un AO induit par un contraceptif oral (œstrogène + vs œstrogène -).....49
- Figure 10.** Moyenne de l'activité enzymatique des différentes peptidases plasmatiques (ECA, CPN, DPPIV et APN) chez les femmes souffrant d'AOO (œstrogène + et œstrogène -) et celles atteintes d'AOH.....50
- Figure 11.** Moyenne de l'activité enzymatique de l'APP plasmatique pour les groupes AOO (œstrogène + et œstrogène -) et AOH.....51
- Figure 12.** Moyenne des  $t_{1/2}$  plasmatiques de la BK exogène ajoutée au plasma de patientes ayant présenté des épisodes d'AO suite à la prise de contraceptifs oraux et celles atteintes d'AOH.....51
- Figure 13.** Moyenne des  $t_{1/2}$  plasmatiques de la des-Arg<sup>9</sup>-BK chez les patientes atteintes d'AOO et d'AOH.....52
- Figure 14.** Concentration de la BK dans l'urine de patients ayant développé des crises d'AO et dans l'urine du groupe témoin.....53
- Figure 15.** Concentration de la des-Arg<sup>9</sup>-BK dans l'urine de patients ayant développé des crises d'AO et dans l'urine du groupe témoin.....54
- Figure 16.** Caractérisation des kinines immunoréactives par HPLC.....55
- Figure 17.** Courbes de fusion pour chacun des gènes d'intérêt étudiés.....56
- Figure 18.** Visualisation de chaque amplicon sur un gel d'agarose 2%.....57
- Figure 19.** Logarithme des moyennes des ratios normalisés ARNm APN, DPPIV, KG/ARNm GAPDH au niveau du rein et de la langue.....58

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b>	Séquence d'acides aminés des différentes kinines.....	11
<b>Tableau 2.</b>	Séquences nucléotidiques des amorces sens et antisens (forward (F) et reverse(R)) .....	45

## Liste des sigles et abréviations

ADNc :	ADN complémentaire
AMPC :	adénosine monophosphate cyclique
AO :	angiooedème
AOA :	angiooedème acquis
AOH :	angiooedème héréditaire
AOO :	angiooedème associé à la prise d'oestrogènes
APN :	aminopeptidase N
APP :	aminopeptidase P
APPc :	aminopeptidase P cytosolique
APPm :	aminopeptidase P membranaire
Asp :	acide aspartique
Arg :	arginine
BK :	bradykinine
C1-INH :	inhibiteur C1
Ca <sup>2+</sup> :	calcium
CPM :	carboxypeptidase M
CPN :	carboxypeptidase N
DAG :	diacylglycérol
Des-Arg <sup>9</sup> -BK :	des-Arginine <sup>9</sup> -bradykinine
Des-Arg <sup>10</sup> -KD :	des-Arginine <sup>10</sup> -kallidine
DIG-OSu :	digoxigenin-3-0-methylcarboxyl-ε-aminocaproic-acid-N-hydroxysuccinimide ester
DO :	densité optique
DPPIV :	dipeptidyl peptidase IV
ECA :	enzyme de conversion de l'angiotensine
EGF :	facteur de croissance épidermique
eNOs :	oxyde nitrique synthase des cellules endothéliales
EPN :	endopeptidase neutre 24.11
FT :	facteur tissulaire
FXII :	facteur XII de la coagulation, facteur de Hageman
FXIIa :	facteur XII activé

GAPDH :	glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase
Gly :	glycine
GMPC :	guanosine monophosphate cyclique
GPI :	glycosylphosphatidylinositol
HCl :	acide chloridrique
HEPES :	acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique
His :	histidine
HPLC :	chromatographie liquide à haute performance
HRPO :	peroxydase de raifort
iECA :	inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IgG :	immunoglobuline G
IL :	interleukine
Ile:	isoleucine
IP <sub>3</sub> :	inositol 1,4,5-triphosphate
KD :	kallidine
kDa :	kilodaltons
KG :	kallitréine glandulaire
KFPM :	kininogène de faible poids moléculaire
KHPM :	kininogène de haut poids moléculaire
K <sub>m</sub> :	constante de Mickaelis-Menten
LPS :	lipopolysaccharide
NGF :	facteur de croissance nerveux
NO :	oxyde nitrique
NOs :	oxyde nitrique synthase
pb :	paire de bases
PCR :	amplification en chaîne par polymérase
PG :	prostaglandine
PGE <sub>2</sub> :	prostaglandine E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub> :	prostaglandine I <sub>2</sub>
Phe :	phenylalanine
PIP <sub>2</sub> :	phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate
PK:	prékallitréine
PKC :	protéine kinase C
PLA <sub>2</sub> :	phospholipase A2

PLC :	phospholipase C
pNA :	para-nitroanilide
Pro :	proline
PSA :	antigène spécifique à la prostate
RB1:	récepteur B1
RB2:	récepteur B2
REA :	essai radioenzymatique
RT :	transcription inverse
Ser :	sérine
t $\frac{1}{2}$ :	demi-vie
TFA :	acide trifluoroacétique
TNF- $\alpha$ :	facteur de nécrose tissulaire- $\alpha$
t-PA :	activateur tissulaire du plasminogène
u-PA :	urokinase
Zn $^{2+}$ :	zinc



## Remerciements

Je tiens à remercier :

- Le Professeur Albert Adam, chercheur dévoué et passionné, pour sa patience, sa disponibilité et ses nombreux conseils.
- Mes collègues et amies du laboratoire, Marie Eve Moreau, Karine Touzin et Anik Desormaux avec qui j'ai eu énormément de plaisir à étudier et qui m'ont été d'une aide considérable tout au long de mon travail de maîtrise.
- Mme Nicole Gervais, assistante de recherche désormais à la retraite, qui a su me montrer avec patience la plupart des techniques de laboratoire et qui était disponible à tous moments pour régler les petits problèmes.
- Le Dr. Christian Drouet pour avoir fourni les nombreux échantillons de plasma et d'urine.
- Le Professeur Yves Lepage ainsi que Miguel Chagnon pour les traitements statistiques.
- Ma famille et mes amis qui m'ont encouragée et supportée tout au long de mes études.
- Tous ceux et celles qui ont contribué d'une quelconque façon à ce que ce projet de maîtrise se concrétise.

## INTRODUCTION

L'angiooedème (AO) demeure une affection inflammatoire très peu comprise par les spécialistes de la santé au niveau physiopathologique, et ce malgré sa première description qui date de plus de 130 ans. Des progrès ont toutefois été réalisés dans la compréhension de cette maladie, particulièrement sur l'aspect génétique qui constitue la forme la plus fréquente d'AO (AO héréditaire ou AOH), mais également au niveau de l'AO acquis (AOA) qui peut être induit par la prise de certains médicaments, tels que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (iECA), ou par la prise d'oestrogènes. On a alors démontré que les kinines, puissants autacoïdes inflammatoires incluant la bradykinine (BK), étaient impliquées dans la physiopathologie de l'AO, bien que leur rôle exact demeure à être défini.

Ce travail de maîtrise s'intéresse à trois aspects principaux : (1) le métabolisme des kinines dans l'AO acquis associé à la prise d'oestrogènes, (2) l'excrétion des kinines urinaires pendant et après un épisode aigu d'AO, et (3) l'expression et la régulation de certains composants du système kalicréines-kinines au niveau oropharyngé.

### I Le système kalicréines-kinines

Le système kalicréines-kinines constitue une cascade métabolique menant à la génération de peptides pro-inflammatoires tels que la BK. Les premières investigations sur l'identification de ce système date du début du siècle dernier avec la découverte d'une substance thermolabile et non dialysable provenant de l'urine qui, lorsque administrée de façon intraveineuse, produisait une hypotension artérielle prolongée chez le chien (Abelous et Bardier, 1909). Depuis, Frey et collaborateurs ont associé cette substance à une hormone excrétée dans l'urine qui affecte les vaisseaux sanguins et la circulation, et l'ont nommé *Kreislaufhormon* qui signifie « hormone circulante » en allemand (Frey et Kraut, 1926 et 1928; Kraut et al, 1928). À la recherche de l'organe qui sécrète cette présumée hormone, Kraut, Werle et collaborateurs identifièrent une substance similaire dans le pancréas (Kraut et al, 1930) et dans le sang (Kraut et al, 1933; Werle, 1936). La substance était présente

sous forme inactive dans les deux organes et pouvait être activée sans difficulté. Ils présumèrent ainsi que celle-ci dérivait du pancréas et la nommèrent « kallicréine », du mot *kallikreas* qui signifie pancréas en grec (Kraut et al, 1930). Ce choix de nom peut paraître inapproprié puisque les différentes kallicréines ne sont ni identiques, ni originaires d'un même précurseur (Werle, 1970). Elles sont toutefois des protéases à sérine possédant des similarités importantes.

Au début de 1930, Werle et collaborateurs ont rapidement découvert la plupart des composants du système kallicréines-kinines connus jusqu'à maintenant. En moins de vingt ans, ils ont caractérisé les kallicréines dans plusieurs compartiments corporels, soit le pancréas, l'urine, le sang et les glandes salivaires, mais aussi dans l'intestin, les poumons, le cerveau et les terminaisons nerveuses (Frey et al, 1950; Schachter, 1969; Werle, 1960; Werle, 1970). En 1937, ils ont démontré que les kallicréines relâchaient, à partir d'un précurseur protéinique dans le plasma, une substance capable de contracter des préparations de muscles lisses isolés (Werle et al, 1937). Cette substance fut nommée « darmkontrahierende Substanz » ou substance DK, qui signifie « substance contractile des intestins » puisqu'elle était capable de contracter une partie d'iléon isolé de cochon. En 1939, Werle et Grunz ont montré que la substance DK diminuait la pression artérielle et que la cystéine potentialisait cette action *in vitro* et *in vivo* en prévenant sa dégradation enzymatique (Werle et Grunz, 1939). Cette démonstration de libération de la substance DK par la kallicréine précéda de deux ans la preuve que la rénine possède sa propre action hypertensive en libérant un peptide à partir d'un substrat dans le plasma (Braun-Menedez et al, 1940; Page et Helmer, 1940). La substance DK changea de terme en 1948, lorsque Werle et Berek recommandèrent de la renommer « kallidine » (KD), alors que son précurseur, le substrat de la kallicréine, fut connu sous le nom de « kallidinogène » (Werle et Berek, 1948).

Suite à ces travaux, Rocha e Silva et collaborateurs ont décrit la libération d'un peptide actif lors de l'incubation de globulines du plasma avec de la trypsine ou avec du venin de serpent, le Borthrops jararaca (Rocha e Sylva et al, 1949). Ce peptide actif fut nommé *bradykinine* (BK) à cause de son action pharmacologique lente, surtout au niveau de la contraction du muscle lisse (en grec, *brady* signifie lent et *kinine* signifie mouvement). Il est depuis évident que le système trypsine-bradykininogène-bradykinine est similaire au système kallicréine-kallidinogène-kallidine.

En 1954, Schachter et Thain ont introduit le terme kinine puisqu'il apparaissait indéniable pour eux, après une comparaison directe, que la KD et la BK appartenaient à la même famille de peptides (Schachter et Thain, 1954). Les kinines sont libérées à partir d'un substrat plasmatique par les kallicréines, la trypsine, le venin de serpent et possiblement par d'autres protéases (Holdstock et al, 1957; Schachter, 1956 et 1960). En 1962, Bhoola et collaborateurs ont introduit le terme *kininogénase* comme nom générique pour toutes les enzymes qui libèrent les kinines et le terme *kininogène* pour le substrat (Bhoola et al, 1962). Depuis, le vocable *kininogénase* inclut les kallicréines, la trypsine, le venin de serpent et les autres enzymes responsables du métabolisme des kinines par la protéolyse du kininogène.

Il a été démontré que les niveaux de kallicréine sont plus faibles chez les patients qui souffrent de certaines maladies telles que l'hypertension, et les maladies cardiovasculaires ou rénales (Chao et Chao, 2005). Le système kallicréines-kinines exerce plusieurs effets incluant l'inhibition de l'apoptose, l'inflammation, l'hypertrophie et la fibrose ainsi que l'augmentation de l'angiogénèse et la neurogénèse dans le cœur, le rein, le cerveau et les vaisseaux sanguins (Chao et Chao, 2005). De plus, l'administration exogène de kallicréine provoque une élévation des niveaux de monoxyde d'azote (NO) en plus de diminuer les niveaux de cytokines pro-inflammatoires, l'activité de la NAD(P)H oxidase et la formation de superoxide. Ces résultats suggèrent donc un rôle nouveau pour le système kallicréines-kinines via ses effets anti-inflammatoires. Ce système pourrait alors s'avérer une cible pharmacologique intéressante dans la prévention et le traitement de l'insuffisance cardiaque, les dommages vasculaires, les maladies rénales de stade avancé ainsi que les accidents vasculaires cérébraux (AVC) (Chao et Chao, 2005; Marcondes et Antunes, 2005).

## **1. Les kallicréines**

Tout comme l'élastase, la thrombine, la plasmine, la chymotrypsine et la trypsine, les kallicréines sont des protéases à sérine. Elles sont donc caractérisées par un résidu sérine et la séquence adjacente d'acides aminés, glycine-acide aspartique-sérine-glycine (Gly-Asp-Ser-Gly), dans leur site catalytique actif (Neurath et al, 1967). Avec des résidus histidine (His) et acide aspartique (Asp), il se forme une

triade (généralement His<sub>41</sub>-Asp<sub>96</sub>-Ser<sub>189</sub>) qui constitue, dans la configuration spatiale appropriée, la triade catalytique nécessaire à l'activité des protéases à sérine. Les kallicroïnes glandulaires (tissulaires) et plasmatique sont les deux kininogénases les plus connues, bien qu'elles diffèrent significativement par leur poids moléculaire, leur spécificité de substrat, leurs caractéristiques immunologiques, la structure des gènes, et le type de kinines libérées (Yousef et Diamandis, 2001). La forme tissulaire sera décrite de façon plus détaillée étant donné que son étude fait partie de ce projet de maîtrise.

## **1.1 Les kallicroïnes glandulaires**

### **1.1.1 Caractéristiques générales**

Jusqu'à récemment (1998), on croyait que le locus du gène de la kallicroïne humaine était constitué de trois gènes : la kallicroïne rénale/pancréatique (KLK1), la kallicroïne glandulaire (KLK2) et l'antigène spécifique à la prostate (PSA) (KLK3), tous situés au locus 19q13.3-q13.4 du chromosome 19 (Evans et al, 1988; Richard et al, 1991; Riegman et al, 1989 et 1992; Qin et al, 1991; Yousef et al, 2005, Diamandis et al, 2000). L'intérêt majeur des deux dernières kallicroïnes repose sur leur expression très restreinte dans les tissus, soit principalement la prostate, ce qui les qualifie d'excellents biomarqueurs pour les maladies de la prostate comme le cancer (Wang et al, 1977,1979 et 1981; Papsidero et al, 1980; Rittenhouse et al, 1998). Il fut découvert que la kallicroïne glandulaire n'était pas codée uniquement par trois gènes, mais bien par 15 différents gènes, possédant tous une certaine homologie (Yousef et al, 2005). Ce mémoire portera uniquement sur la kallicroïne rénale/pancréatique humaine (codée par le KLK1) puisqu'elle est la seule kallicroïne à posséder une activité kininogénase. À des fins pratiques, elle sera désignée sous le terme de « kallicroïne glandulaire » (KG).

L'expression de la KG chez l'humain est plus élevée dans le pancréas, les reins et les glandes salivaires (Fukushima et al, 1985), et elle est également exprimée à plus faible niveau dans d'autres tissus tels que les glandes sudoripares, les intestins, le système nerveux central, le cœur, l'utérus, la prostate, les testicules, les seins et le placenta (Bhoola et al, 1992; Yousef et Diamandis, 2001). Elle possède un poids moléculaire se situant entre 25 et 45 kilodaltons (kDa).

La régulation de la synthèse de la KG fut analysée chez différentes espèces animales, et il a été montré que celle-ci n'était pas directement régulée par les androgènes, ni dans les glandes salivaires, ni dans le rein (Clements et al, 1990; Van Leeuwen et al, 1986 et 1987; Clements et al, 1988; Penschow et al, 1991). Elle n'est pas non plus contrôlée par l'hormone thyroïdienne et les résultats portant sur la régulation par les minéralocorticoïdes sont non concluants (Miller et al, 1984 et 1985). Par contre d'autres données suggèrent une régulation transcriptionnelle positive de la KG par les oestrogènes (Clements et al, 1986 et 1989) et par la dopamine dans l'hypophyse du rat (Pritchett et Roberts, 1987). La démonstration que l'expression de la KG dans l'endomètre chez la femme est plus élevée au milieu du cycle menstruel constitue également une preuve d'une régulation à la hausse par les oestrogènes dans ce tissu (Clements et al, 1994).

L'activité enzymatique de la KG peut être inactivée par différents inhibiteurs de protéases à sérine, tels que l'aprotine (Margolius, 1996) et la kallistatine (Zhou et al, 1992).

La KG libère la lysine-bradykinine (kallidine ou KD) à partir du kininogène de faible poids moléculaire (KFPM) (Yousef et al, 2001). Toutefois, on suppose que les rôles fonctionnels de cette enzyme pourraient être spécifiques selon le type de cellules puisque la KG possède une expression variable dans les tissus (Bhoola et al, 1992; Schachter, 1980). Outre son activité kininogénase, la KG joue un rôle dans la synthèse de certains facteurs de croissance telles que le NGF (facteur de croissance nerveux) et l'EGF (facteur de croissance épidermique) étant donné sa présence dans l'hypophyse, le pancréas et d'autres tissus (Bhoola, 1971; Bothwell et al, 1979; Mason et al, 1983). La KG influence aussi l'activité de plusieurs protéines et enzymes (Bhoola et al, 1992). En effet, il a été démontré que la kallicréine pancréatique pouvait cliver la pro-insuline pour former la molécule active (Ole-Moiyoi et al, 1979). De plus, la KG joue un rôle dans l'hydrolyse de la lipoprotéine de faible densité (Cardin et al, 1984), le précurseur du facteur natriurétique (Currie et al, 1984), la prorénine (Sealy et al, 1978; Derkx et al, 1979 et 1987), l'angiotensinogène (Arakawa et Maruta, 1980), le peptide vasoactif intestinal (Mutt et Said, 1974), et la procollagénase (Eeckhout et Vaes, 1977). Son pouvoir kininogénase reste cependant sa fonction principale, connue à ce jour.

### 1.1.2 La kallibréine rénale

La kallibréine rénale est impliquée dans le contrôle du débit sanguin rénal, la balance hydrique et électrolytique, et dans la pathophysiologie de l'hypertension et d'autres maladies comme le diabète (Chao et Chao, 2005). L'ARNm de la kallibréine a été localisé au niveau du tubule distal cortical, ce qui en fait la région responsable de la synthèse de la kallibréine rénale (Fuller et al, 1986). Les concentrations de kallibréine rénale sont modulées positivement par plusieurs facteurs incluant la balance sodique (Margolius et al, 1974) et certaines hormones telles que la rénine (Ura et al, 1983), la vasopressine (Fejes-Toth et al, 1980) et les prostaglandines (PG) (Chapman et al, 1986).

À la suite de nombreuses investigations, il a été démontré que les systèmes kallibréines-kinines, rénine-angiotensine ainsi que celui des prostaglandines interagissent au niveau du rein et sont intimement impliqués dans le contrôle du débit sanguin rénal. En effet, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) inactive la BK, mais est aussi responsable de la synthèse de l'angiotensine II à partir de l'angiotensine I (Fuller et al, 1986). De plus, les kinines peuvent induire la libération des PGE<sub>2</sub> dans le rein via l'activation de la phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) (McGiff et al, 1972). Ainsi, les kinines et les PG modulent le débit sanguin rénal puisqu'elles possèdent une activité vasodilatatrice au niveau du rein, d'où leur importance dans le maintien de la pression systolique sanguine (Fuller et al, 1986).

Des études épidémiologiques ont démontré que chez des patients souffrant d'hypertension artérielle, les concentrations de kallibréine dans le rein étaient faibles; il existe donc une relation inverse entre la pression sanguine et la kallibréine rénale (Zinner et al, 1976 et 1978). De plus, des études axées sur l'aspect génétique de l'hypertension ont démontré que le promoteur du gène de la KG était hautement polymorphique et pouvait ainsi être associé au développement de certaines maladies cardiaques et rénales (Berry et al, 1989, Song et al, 1997; Yu et al, 2002). Plus précisément, une mutation au niveau de l'exon 3 du gène de la KG a été identifiée (Slim et al, 2002). Cette mutation se caractérise par une substitution de l'arginine (Arg, R) en position 53 par une histidine (R53H) au niveau du site actif, entraînant une diminution considérable de l'activité enzymatique de la kallibréine *in vitro*. En moyenne, l'activité de la kallibréine rénale serait diminuée de 50% chez les individus hétérozygotes R53H en comparant avec des homozygotes R53R, ce qui démontre l'effet fonctionnel puissant de la mutation génique. Cette mutation prédisposerait

alors les individus au développement de maladies cardiovasculaires, rénales ainsi que l'hypertension (Azizi et al, 2005).

### **1.1.3 La kallibréine salivaire**

La kallibréine a été isolée des glandes submandibulaires de plusieurs espèces (humain, cochon, rat, souris), mais parmi elles, les glandes submandibulaires de souris représentent celles qui contiennent la concentration la plus élevée de kallibréine (Erdös et al, 1968). Comparées aux glandes submandibulaires, les concentrations en kallibréine dans les glandes sublinguales et parotides sont négligeables (Werle et al, 1936).

Le rôle précis de la kallibréine des glandes salivaires n'est pas très bien établi. Toutefois, sa distribution luminale suggère une fonction exocrine, et la kallibréine est facilement mesurable dans la salive (Rockel et al, 1985). D'autres travaux ont suggéré un rôle dans la régulation locale du débit sanguin, et elle pourrait peut-être même contrebalancer le rôle vasoconstricteur de la rénine présente dans les glandes submandibulaires de souris (Bhoola et al, 1979; Orstavik et al, 1982). De plus, par analogie avec le rein, la kallibréine pourrait également réguler la composition ionique de la salive (Fuller et Funder, 1986). Plusieurs études menées sur des modèles animaux ont démontré que l'injection d'extraits de glandes submandibulaires induisait une diminution des risques de rejet de greffe et de réactions d'hypersensibilité retardée (Kongshavn et Bliss, 1970; Abdelhaleem et Sabbadini; 1992; Kemp et al, 1986; Kongshavn et Lapp, 1972; Koch et Rowe, 1976). À la suite de ces investigations, il a été démontré que la kallibréine salivaire possédait un rôle immunorégulateur important (Nagy et al, 1997). En effet, lorsque la kallibréine salivaire de rat était injectée à des souris, on observait une diminution de la réponse inflammatoire au contact d'un haptène, libérant ainsi des lymphocytes T responsables du développement de la réaction d'hypersensibilité retardée. De plus, les effets observés étaient abolis lorsque l'aprotine était injectée juste avant l'administration de kallibréine salivaire. Leurs résultats suggèrent donc que sous le contrôle endocrinien, la kallibréine salivaire chez le rat est une enzyme immunorégulatrice systémique capable d'induire une réponse anti-inflammatoire (Nagy et al, 1997).



## 1.2 La kalllicréine plasmatique

La kalllicréine plasmatique est codée par un seul gène composé de 15 exons et 14 introns, localisé au locus 4q35 du chromosome 4 (Beaubien et al, 1991). Elle est synthétisée et sécrétée par le foie sous forme inactive soit en prékalllicréine (Wu et al, 2005). La prékalllicréine humaine consiste en une chaîne unique de glycoprotéine composée de 619 acides aminés et ayant un poids moléculaire d'environ 85kDa (Chung et al, 1986).

La kalllicréine plasmatique, l'enzyme active, est formée suite au clivage de la prékalllicréine par le facteur XIIa de la coagulation (ou facteur de Hageman) aux liaisons peptidiques Arg<sup>371</sup>-isoleucine (Ile)<sup>372</sup> (Blais et al, 2000). Cette hydrolyse aboutit à la formation d'une enzyme composée d'une chaîne lourde en partie amino-terminale (371 acides aminés, 55 kDa) et d'une chaîne légère en partie carboxy-terminale (248 acides aminés, 36 kDa), toutes deux étant reliées par un pont disulfure (Chung et al, 1986). La chaîne légère contient le site actif de l'enzyme composé de trois acides aminés importants (His<sup>415</sup>, Asp<sup>464</sup> et Ser<sup>559</sup>) qui sont directement impliqués dans l'activité catalytique. La kalllicréine plasmatique libère la BK à partir du kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) par hydrolyse des liaisons peptidiques Lys<sup>362</sup>-Arg<sup>363</sup> et Arg<sup>371</sup>-Ser<sup>372</sup>.

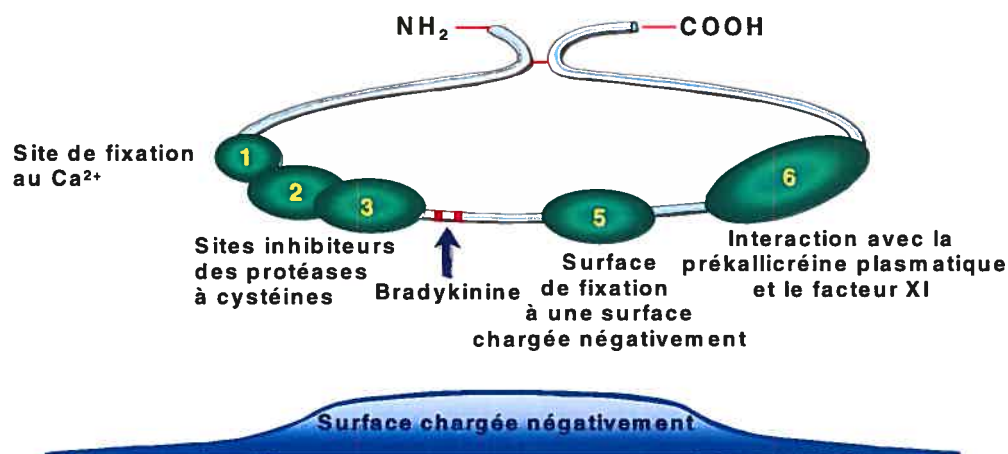
Une fois activée dans le plasma, 52% de l'activité enzymatique de la kalllicréine est neutralisée par l'inhibiteur C1 (C1-INH) et 35% par l' $\alpha_2$ -macroglobuline (Harpel et al, 1985). L'antithrombine III contribue très faiblement à l'inhibition de la kalllicréine (van der Graaf, 1983).

## 2. Les kininogènes

Chez les mammifères, il existe trois types de kininogènes (Müller-Esterl, 1986), soit le KHPM (88 à 115 kDa), le KFPM (50 à 68 kDa) et le T-kininogène (68 kDa), ce dernier existant seulement chez le rat (Okamoto et Greenbaum, 1983). Bien qu'ils possèdent une masse moléculaire et des fonctions distinctes, les différents types de kininogènes sont pourvus d'une même structure de base. Ils sont composés d'une chaîne lourde de 50 à 60 kDa en position amino-terminale, une séquence kininofmatrice et une chaîne légère d'une longueur variable en partie carboxy-terminale. La chaîne légère permet de différencier le KHPM du KFPM. En fait, la

structure primaire de la chaîne lourde et la séquence kininoformatrice sont communes aux deux types de kininogènes, le KHPM et le KFPM. La chaîne légère du KHPM possède une masse moléculaire de 45 à 58 kDa, tandis que celle du KFPM est de seulement 4 ou 5 kDa (Müller-Esterl, 1986). Le foie constitue le site principal de la biosynthèse des kininogènes, bien qu'on retrouve une expression mineure dans d'autres cellules, telles que les plaquettes (Schmaier et al, 1986), les cellules de glandes submandibulaires (Chao et Chao, 1988), les cellules rénales (Figuerola et al, 1988) et endothéliales (van Iwaarden et al, 1988b) ainsi que les leucocytes polynucléaires (Figuerola et al, 1990). Les deux formes de kininogènes plasmatiques sont produites par un seul gène situé au chromosome 3 au locus q26, appelé gène K (Cheung et al, 1992).

La chaîne lourde des KHPM et KFPM est constituée de trois unités répétitives, soit les domaines 1, 2 et 3 qui sont illustrés à la figure 1 (Kellermann et al, 1986). Le domaine 1 contient un site de liaison du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), tandis que les domaines 2 et 3 sont plus apparentés et forment les unités structurales pour l'inhibition des protéases à cystéine, comme la papaïne et les cathepsines B, H et L (Salvesen et al, 1986). Le domaine 4, situé entre la chaîne lourde et la chaîne légère, possède la séquence kininoformatrice : la BK est libérée à partir du KHPM et la KD à partir du KFPM. Les domaines 5 et 6 forment la chaîne légère du KHPM et sont responsables de son activité procoagulante. En fait, le domaine 5, qui est riche en résidus histidine, proline et lysine, est capable de fixer le KHPM aux surfaces chargées négativement (Müller-Esterl et al, 1986). Le domaine 6 est responsable de la liaison du KHPM avec la prékallicréine et le facteur XI (Thompson et al, 1977). La chaîne légère du KFPM est constituée uniquement du domaine 5, et son rôle demeure toujours inconnu.



**Figure 1.** Représentation des 6 domaines du KHPM et leur fonction primaire. Les domaines 1,2 et 3 constituent la chaîne lourde, le domaine 4 comporte la partie kininogénase, et les domaines 5 et 6 représentent la chaîne légère. (Kaplan et al, 1997)

### 3. Les kinines

Les kinines appartiennent à une petite famille de peptides possédant 9 à 11 acides aminés, incluant la BK, la KD et leurs métabolites actifs respectifs, la des-arginine<sup>9</sup>-bradykinine (des-Arg<sup>9</sup>-BK) et la des-Arginine<sup>10</sup>-kallidine (des-Arg<sup>10</sup>-KD) (tableau 1) (Moreau et al, 2005a). Les kinines sont des peptides autacoïdes et des neuromédiateurs centraux dont les actions biologiques et pharmacologiques principales incluent l'homéostasie cardiovasculaire, l'inflammation et la nociception. Comme il a été décrit précédemment, la BK est libérée à partir du KHPM sous l'action de la kallibréine plasmatique, tandis que la formation de la KD résulte de l'hydrolyse du KHPM par la kallibréine glandulaire. L'aminopeptidase N peut toutefois convertir la KD en BK en y enlevant le résidu lysine à la partie aminotermine (Ward et al, 1990).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BK	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg-OH
KD	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe-Arg-OH
des-Arg <sup>9</sup> -BK	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe-OH	
des-Arg <sup>10</sup> -KD	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe-OH

**Tableau 1. Séquence d'acides aminés des différentes kinines.**

#### 4. Les récepteurs des kinines

Les effets pharmacologiques des kinines se manifestent par leur interaction avec des récepteurs spécifiques. La présence de différents agonistes a permis à Regoli et Barabé de définir deux types de récepteurs des kinines (Regoli et al, 1977, Regoli et Barabé, 1980). Ainsi, les récepteurs de type B1 (RB1) sont spécifiques pour les kinines dépourvues du résidu arginine en partie carboxy-terminale comme la des-Arg<sup>9</sup>-BK et la des-Arg<sup>10</sup>-KD, alors que les récepteurs de type B2 (RB2) sont stimulés par les peptides contenant une séquence complète telle que la BK et la KD.

Le RB2 est constitutif et ubiquitaire, tandis que le RB1 est généralement absent des tissus sains, mais exprimé chez les animaux présentant une infection ou une inflammation (Couture et al, 2001); il est donc induit lors de lésions tissulaires ou suite à une exposition à des endotoxines bactériennes ou à des cytokines proinflammatoires telles que l'interleukine-1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et le facteur de nécrose tissulaire (TNF)- $\alpha$ . Le RB1 participe également à la phase chronique de la réponse inflammatoire et de la douleur, alors que le RB2 est responsable de la phase aiguë de l'inflammation et de la douleur.

L'interaction des kinines avec leurs récepteurs permet d'activer plusieurs voies de transduction (voir figure 2) (Moreau et al, 2005a). La liaison de l'agoniste à son récepteur entraîne l'activation de la phospholipase C (PLC)- $\beta$  qui est responsable de l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) (Marceau et al, 2002). L'IP<sub>3</sub> provoque alors la libération du Ca<sup>2+</sup> dans le cytosol; la concentration de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire est ensuite augmentée entraînant à son tour l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). De plus, l'augmentation de Ca<sup>2+</sup> induit la synthèse d'oxyde nitrique (NO) via la NO

synthase (NOs) dépendante de la voie calcium-calmoduline (Busse et Fleming, 1996; Leeb-Lundberg et al, 2005). L'activation de l'adénylyl cyclase ou de la guanylyl cyclase par les PG et le NO constitue un mécanisme de transduction qui mène à la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et de guanosine monophosphate cyclique (GMPc), créant un effet vasodilatateur puissant.

En plus de ces voies classiques, le RB2 peut activer des protéines qui possèdent une activité tyrosine kinase (Velarde et al, 1999). Le RB2 activé libère alors la protéine kinase C (PKC) qui phosphoryle les MAP-kinases, la PLC et la protéine Hsp90 et interagit directement avec la NOs des cellules endothéliales (eNOs) ce qui permet la production de NO (Venema, 2002). Le RB1 interagit également directement avec les protéines  $G\alpha_q$  et  $G\alpha_i$  et a recours essentiellement aux mêmes voies de signalisation que le RB2. Il est surtout associé à l'activation de la PLC et à la voie du  $IP_3$ , mais agit aussi via la  $PLA_2$  et les MAP-kinases (Marceau et al, 1998).

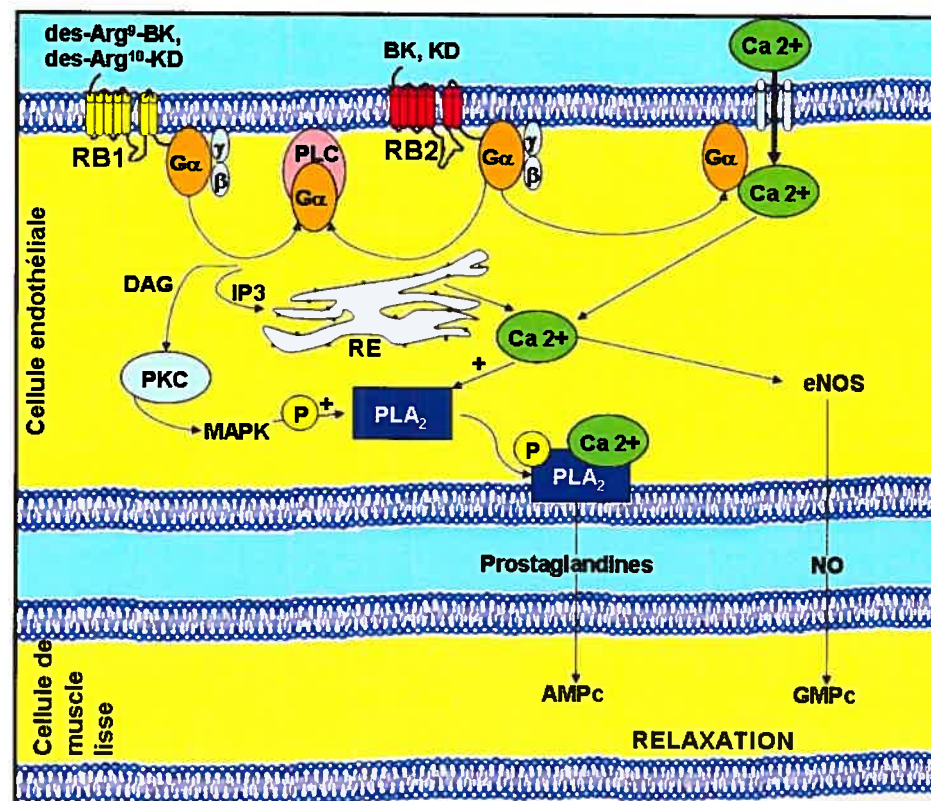


Figure 2. Les récepteurs des kinines et leurs voies de signalisation. (Moreau et al, 2005a)

## **5. Les systèmes kininogénés**

Il existe deux voies principales de formation des kinines, le système plasmatique et le système tissulaire.

### **5.1 Le système de contact du plasma**

Le concept d'activation du système de contact a été développé initialement à la suite d'investigations qui ont montré que l'addition de surface chargée négativement dans le plasma provoquait l'activation du système de la coagulation. Le contact du plasma avec cette surface déclenche l'autoactivation du facteur XII (FXII, facteur de Hageman) en facteur XII activé (FXIIa) qui transforme la prékallicréine en kallicréine, capable d'hydrolyser le KHPM pour en libérer la BK (voir figure 3) (Joseph et Kaplan, 2005). L'activation du FXII n'est pas seulement la première étape de l'initiation de la voie intrinsèque de la coagulation et de la formation de kinines, elle active également le système du complément et le système fibrinolytique (Merlini et al, 2004). En effet, il est maintenant évident que le système de contact joue un rôle essentiel dans l'activation de la voie de la fibrinolyse via la formation de la plasmine par le facteur XIIa (Miles et al, 1983; Ghebrehiwet et al, 1981). De plus, le facteur XIIa et la kallicréine sont responsables de l'activation des sous-unités r et s du premier composant du complément (C1) (Joseph et Kaplan, 2005).

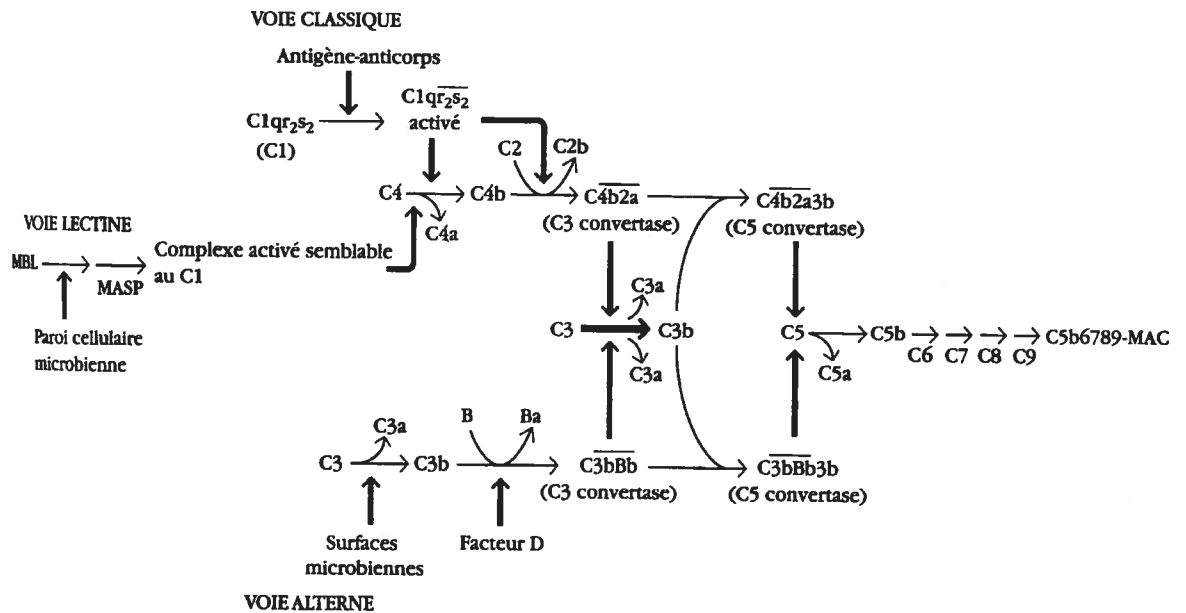


L'activation de la voie classique débute habituellement par la formation de complexes antigènes-anticorps solubles (complexes immuns) (Goldsby et al, 2000). La protéine précurseur C1 est composée des sous-unités C1q, C1s et C1r. Lors de l'activation par un complexe immunitaire, le changement de conformation du C1q entraîne l'activation des deux autres sous-unités. Le C1s activé initie une cascade qui forme un complexe d'attaque membranaire et qui relâche les anaphylatoxines C3a, C4a et C5a qui sont des peptides médiateurs de l'inflammation.

La purification et la caractérisation du composant C1 du complément, ainsi que ses sous-unités, fut possible grâce à des études effectuées vers la moitié du siècle dernier (Lepow et al, 1956). Les auteurs ont décrit une estérase qui inhibe le C1 et l'on nommée inhibiteur C1 (C1-INH). Le C1-INH forme un complexe avec les protéases C1r et C1s, ce qui les dissocie du C1q et prévient ainsi les coupures de C4 et C2 dans la constitution de la C3 convertase. Le C1-INH joue aussi un rôle important dans l'inactivation du système de contact puisqu'il inhibe le facteur XII et la kallikréine (Davis, 2003).

Des déficits congénitaux en protéines régulatrices du complément ont été rapportés. Entre autre, le déficit en C1-INH est une maladie héréditaire qui conduit au développement de l'angioedème, d'où l'importance de sa description pour une meilleure compréhension de cette affection qui fait partie intégrante de ce mémoire.





**Figure 4. Vue d'ensemble des trois voies d'activation du complément : la voie classique, la voie alterne et la voie lectine. (Goldsby et al, 2000)**

### 5.1.2 Le système fibrinolytique

La voie de la fibrinolyse permet la dissolution d'un caillot sanguin grâce à une enzyme protéolytique, la plasmine, formée à partir du plasminogène. Plusieurs voies d'activation du système fibrinolytique ont été identifiées. Aussi, la kallibréine et le facteur XIa ont été identifiés comme étant des activateurs du plasminogène (Colman, 1969; Mandle et Kaplan, 1979; Thompson et al, 1977). Le facteur XIIa peut également convertir le plasminogène en plasmine, mais son activité correspond à seulement 5% de celle de la kallibréine (Goldsmith et al, 1978). L'urokinase est aussi impliqué dans l'activation du plasminogène, et d'autres études ont démontré que la kallibréine était capable d'activer la pro-urokinase pour former l'urokinase (Hauert et al, 1989; Ichinose et al, 1986; Miles et al, 1981). L'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) demeure par contre le principal activateur de plasminogène dans le plasma; par ailleurs, la BK formée par le système de contact induirait la libération du t-PA (Brown et al, 1997).

## 5.2 Le système kininogène au niveau des cellules endothéliales

Des études ont identifié un autre mécanisme de l'activation du système kallibréines-kinines qui dépendrait de la liaison de certaines cellules, telles que les leucocytes, les plaquettes, les cellules endothéliales et les myocytes, à des composants du système d'activation de contact (Zhao et al, 2001). En effet, le KHPM se lie spécifiquement à ces cellules dans une réaction réversible dépendante au zinc ( $Zn^{2+}$ ) (van Iwaarden et al, 1988a). Au niveau du KHPM, cette liaison implique respectivement les domaines 3 et 5 des chaînes lourde et légère, et serait considérée comme le récepteur de la prékallibréine sur les cellules endothéliales (Hasan et al, 1995; Herwald et al, 1995; Motta et al, 1998). Cette liaison provoquerait l'activation de la prékallibréine en kallibréine, ce qui permettrait la relâche de la BK par le KHPM.

## 6. Le métabolisme des kinines

La nature des enzymes responsables du métabolisme des kinines, appelées kininases, a été largement étudiée (Erdös, 1989 et 1990). Les principales sont l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA, kininase II), les carboxypeptidases N et M (CPN et CPM, kininase I), l'endopeptidase neutre 24.11 (EPN) et l'aminopeptidase P (APP). On retrouve également la dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) et l'aminopeptidase N (APN), agissant de façon secondaire dans le métabolisme des kinines. Les études sur l'identification des différentes kininases ont débuté dans les années 60, tout juste après l'isolation de la BK (Elliott et al, 1960) et sa synthèse (Boissonnas et al, 1960). La première kininase à être identifiée fut la CPN humaine plasmatique (Erdös et Yang, 1970). L'ECA, pour sa part, a été décrite pour la première fois au milieu des années 50 (Skeggs et al, 1956), mais ce n'est pas avant les années 70 que les deux enzymes, ECA et kininase II, furent considérées comme identiques (Yang et al, 1970; Iqic et al, 1972). À la suite d'investigations portant sur le métabolisme de la BK dans la circulation pulmonaire, Ryan et collaborateurs ont identifié une enzyme qui clive le lien peptidique  $Arg^1-Pro^2$  de la BK (Ryan et al, 1968); elle fut associée à l'APP dont l'activité avait été préalablement observée au niveau des érythrocytes et du rein (Erdös et al, 1963).

Finalement, en 1974, l'EPN fut identifiée au niveau de la bordure en brosse des cellules épithéliales du rein (Kerr et Kenny, 1974).

Ces enzymes partagent des caractéristiques communes. En effet, elles nécessitent un atome de  $Zn^{2+}$  dans leur région catalytique pour hydrolyser leur substrat; c'est pourquoi elles sont appelées métallopeptidases à  $Zn^{2+}$  (Erdős et Skidgel, 1997). La DPPIV constitue la seule exception, étant une peptidase à sérine. Pour sa part, l'APN n'intervient pas dans le catabolisme de la BK, mais permet de former ce peptide à partir de la KD. La contribution relative de chaque peptidase dans le métabolisme des kinines sera présentée plus loin sous forme de figure (voir section 6.2.2, figure 5).

## 6.1 Enzymes impliquées dans le métabolisme des kinines

### 6.1.1 L'enzyme de conversion de l'angiotensine I

L'ECA, aussi appelée kininase II (EC 3.4.15.1, peptidyl dipeptidase A), codée par son gène situé au locus 17q23 du chromosome 17 (Rigat et al, 1990), est une métallopeptidase à  $Zn^{2+}$  liée à la membrane plasmique par sa partie carboxy-terminale. Elle est orientée de façon à ce que ses sites catalytiques, au nombre de deux, soient exposés à la face externe de la membrane cellulaire (Wei et al, 1991).

Il existe deux formes d'ECA membranaire qui sont exprimées chez l'humain (Turner et Hooper, 2002). La plus lourde (150 à 180 kDa), connue sous le terme de ECA somatique, est composée d'environ 1300 acides aminés et est présente dans la plupart des tissus (endothélium vasculaire, surface endothéliale des poumons, membrane de la bordure en brosse des reins, intestins, placenta et plexus choroïdien). La deuxième isoenzyme, dite germinale, est l'ECA testiculaire (100 à 110 kDa). Elle est composée de seulement 730 acides aminés et jouerait un rôle dans la fertilité mâle, étant exprimée uniquement dans les testicules (Hagaman et al, 1998).

L'ECA inactive la BK en hydrolysant deux liens peptidiques situés en partie carboxy-terminale, d'abord le dipeptide  $Phe^8-Arg^9$  et ensuite le lien  $Phe^5-Ser^6$  pour ainsi former la  $BK_{[1-5]}$  inactive (Yang et al, 1970 et 1971). L'ECA peut également dégrader le métabolite actif de la BK, la  $des-Arg^9-BK$ , en enlevant le tripeptide  $Ser^6-Pro^7-Phe^8$  produisant ainsi le même pentapeptide (Inokushi et Nagamatsu, 1981; Oshima et al, 1985). De plus, l'ECA peut activer l'angiotensine II à partir de l'angiotensine I, un vasoconstricteur puissant, ce qui permet de la qualifier

d'angiotensinase. Toutefois, étant donné son affinité beaucoup plus élevée pour la BK, avec une constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) d'environ 0,18  $\mu$ M, comparativement à un  $K_m$  de 16  $\mu$ M pour l'angiotensine I, elle est maintenant considérée principalement comme une kininase plutôt qu'une angiotensinase (Jaspard et Alhenc-Gelas, 1995).

Une isoforme de l'ECA a été identifiée, désignée sous le terme « ECA2 ». Bien que l'ECA2 possède une distribution plus faible dans certains tissus (testicules, cœur, rein) que l'ECA, elle est considérée comme similaire à l'ECA somatique en étant également une glycoprotéine membranaire au niveau endothélial et épithélial. L'ECA2 hydrolyse efficacement la des-Arg<sup>9</sup>-BK, mais n'agit pas sur le métabolisme de la BK (Vickers et al, 2002). De plus, l'ECA2 n'est pas inhibée par les mêmes inhibiteurs que l'ECA.

La régulation de l'ECA ainsi que son activité dans les tissus sont sous un puissant contrôle génétique. En effet, un polymorphisme de type insertion/délétion (I/D) a été localisé dans la région non codante du gène (Rigat et al, 1990). L'insertion qui crée l'allèle I est une séquence alu répétée (287 pb) dans l'intron 16 du gène de l'ECA tandis que l'allèle D est associé à une absence de cette séquence. Il existe une relation entre ce polymorphisme et l'activité de l'ECA circulante, celle-ci étant plus élevée chez les individus qui sont homozygotes pour l'allèle D, plus faible chez ceux qui sont homozygotes pour l'allèle I, et intermédiaire pour les hétérozygotes. En effet, les niveaux d'ECA dans le plasma chez les homozygotes DD sont presque le double de ceux des homozygotes II (Rigat et al, 1990; Danser et Schunkert, 2000; Brown et al, 1998). Étant donné que le génotype de l'ECA détermine la dégradation de la BK, ceci suggère un mécanisme où l'allèle D de l'ECA pourrait être associée à certains effets cardiovasculaires délétères (Brown et al, 1998).

### 6.1.2 L'aminopeptidase P

L'APP (EC 3.4.11.9, X-prolyl aminopeptidase) existe sous deux formes, soit la forme membranaire (APPM), codée par le gène XPNPEP2 localisé au locus Xq25-26.1 du chromosome X (Sprinkle et al, 1998), et la forme cytosolique (APPc), codée par le gène XPNPEPL localisé au chromosome 10pter-q23.33 (Sprinkle et al, 2000). L'APPM est une protéine glycosylée qui est liée à la membrane plasmique des

cellules épithéliales et endothéliales par un pont glycosylphosphatidylinositol (GPI) et qui renferme le  $Zn^{2+}$  à son site actif (Molinaro et al, 2004).

L'APP possède plusieurs rôles physiologiques, incluant des rôles dans le métabolisme de peptides régulateurs (kinines) de la pression artérielle et de la réponse inflammatoire (Cyr et al, 2001). Aussi, l'APP joue un rôle en tant que kininase. Elle inactive la BK en la transformant en  $BK_{[2-9]}$ , de même que la des-Arg<sup>9</sup>-BK pour former un peptide inactif, la  $BK_{[2-8]}$ . Elle constitue d'ailleurs la principale voie de dégradation de la des-Arg<sup>9</sup>-BK au niveau du plasma (Cyr et al, 2001).

La présence d'une proline en position P<sub>1</sub>' est nécessaire à l'activité catalytique de l'APP. L'apstatin est un inhibiteur sélectif de l'APP. Aussi, puisque l'APP est une métallopeptidase, son activité est abolie par des chélateurs d'ions métalliques divalents, comme l'EDTA (Molinaro et al, 2004). L'activité de l'APP est ubiquitaire, et a été retrouvée dans une large variété d'organismes, incluant les bactéries, les levures et les vertébrés.

Cette enzyme a suscité un grand intérêt lorsque Blau et collaborateurs ont rapporté une mutation génétique de l'APP (Blau et al, 1988). Des études menées dans notre laboratoire ont associé une faible activité plasmatique de l'APP à une dégradation moindre de la des-Arg<sup>9</sup>-BK, ceci observé chez des patients ayant connu des effets secondaires associés aux inhibiteurs de l'ECA (iECAs) tels que l'angiooedème (AO), les réactions anaphylactoïdes en hémodialyse et les réactions d'hypotension sévère lors de transfusions sanguines (Adam et al, 2002; Molinaro et al, 2002b et 2002c; Cyr et al, 1999; Blais et al, 1999a et 1999b).

### 6.1.3 Les carboxypeptidases

Il existe deux types de carboxypeptidases, la carboxipeptidase N (CPN, EC 3.4.17.3), et la carboxypeptidase M (CPM, EC 3.4.17.12), toutes deux étant regroupées sous le terme de *kininase I*.

La CPN est synthétisée par le foie et relâchée dans la circulation sous forme de glycoprotéine tétramérique soluble (Plummer et Hurwitz, 1978). Elle possède un poids moléculaire de 280 kDa, composée de deux sous-unités identiques de 83 kDa chacune, fortement glycosylées, mais dépourvues d'une activité enzymatique, et deux petites sous-unités de 48 à 55 kDa non-glycosylées, mais possédant un pouvoir catalytique (Levin et al, 1982). Le gène qui code pour les sous-unités de 83 kDa est

localisé au locus 8p22-23 du chromosome 8 (Tan et al, 1990), tandis que celui qui code pour les sous-unités de 48 à 55 kDa est localisé au locus 10q23-25 du chromosome 10 (Gebhard et al, 1989).

La CPM est une glycoprotéine monocaténaire liée à la membrane cellulaire via un pont GPI. Elle possède une masse moléculaire de 62 kDa (Deddish et al, 1990). La CPM est présente dans différents tissus, dont les poumons et le rein, mais aussi les intestins, le cerveau et les nerfs périphériques (Skidgel et al, 1984). Le gène codant pour la CPM se situe au locus 12q15 du chromosome 12 (Kas et al, 1995).

Les carboxypeptidases hydrolysent différents peptides contenant une arginine ou une lysine en partie carboxy-terminale (Skidgel, 1988). Ainsi, elles libèrent l'arginine en partie carboxy-terminale de la BK, formant son métabolite actif, la des-Arg<sup>9</sup>-BK, capable de stimuler les récepteurs de type B1 dans le plasma humain. La kininase I représente toutefois une voie métabolique mineure, sauf si l'ECA est inhibée (Blais et al, 1997a). En plus des kinines, la CPN hydrolyse d'autres peptides tels que les enképhalines, les anaphylatoxines (C3a, C5a) et les fibrinopeptides (Bhoola et al, 1992).

#### 6.1.4 L'endopeptidase neutre 24.11

L'EPN (EC 3.4.24.11) est une métalloprotéinase à Zn<sup>2+</sup> ancrée à la membrane par un peptide signal situé à la partie amino-terminale (Roy et al, 1993). Le gène, nommé MME, est localisé au locus 3q21-27 au chromosome 3 (Barker et al, 1989). L'EPN possède une large distribution tissulaire : le rein, le système nerveux central, l'endothélium, les testicules, les poumons, les glandes salivaires et la moelle osseuse. Cependant, contrairement à l'ECA, son expression au niveau des cellules endothéliales vasculaires est plutôt faible (Johnson et al, 1985).

Tout comme l'ECA, l'EPN inactive la BK en clivant le lien Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup> pour générer le peptide inactif BK<sub>[1-7]</sub> (Gafford et al, 1983). Par contre, elle diffère de l'ECA pour le métabolisme de la des-Arg<sup>9</sup>-BK, puisqu'elle clive les liens Gly<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup> pour produire deux peptides inactifs, Arg<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup> et Phe<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>.

Le rôle physiologique de l'EPN dépend de sa localisation et de la disponibilité du substrat (Molinaro et al, 2002a). Par exemple, dans le rein, cette enzyme régule la dégradation des peptides natriurétiques et de la BK, alors qu'au niveau de l'endothélium coronarien et des préparations de cardiomyocytes de rats, elle limite les propriétés vasodilatatrices de la BK. Pour cette raison, l'EPN pourrait

devenir une importante cible pharmacologique cardiovasculaire. De plus, cette enzyme exerce des effets anti-inflammatoires en limitant l'activité pharmacologique des peptides vasodilatateurs comme les kinines.

### 6.1.5 L'aminopeptidase N

L'aminopeptidase N (APN, alanyl aminopeptidase, EC 3.4.11.2) est une métalloprotéinase de 150 kDa qui hydrolyse préférentiellement les acides aminés neutres en position amino-terminale des oligopeptides (Rawlings et Barrett, 1993). Le gène de l'APN est localisé sur le chromosome 15 au locus 15q25-q26 (Watt et Willard, 1990). L'APN est une glycoprotéine de type II associée à la membrane avec une activité catalytique dépendante du  $Zn^{2+}$  qui est exprimée de façon constitutive à la surface d'une large variété de cellules. Elle a été identifiée comme étant la même protéine que l'antigène de différenciation CD13, retrouvé à la surface des leucocytes (Look et al, 1989).

L'APN est exprimée de façon prédominante au niveau de l'intestin où elle participe à l'hydrolyse des molécules qui n'ont pas encore été absorbées. Elle est également exprimée dans le rein et certaines cellules inflammatoires (granulocytes et monocytes), et de façon mineure dans d'autres tissus comme l'endomètre (Classen-Linke et al, 1987), la rate et le cerveau (Kenny et al, 1987). Le rôle physiologique de l'APN exprimée dans ces autres tissus n'est toujours pas clairement élucidé, bien qu'il fut suggéré qu'elle pourrait être impliquée dans la dégradation de peptides et de cytokines, tels que l'IL-6 et l'IL-8 (Ward et al, 1990). L'APN pourrait également contribuer à la dégradation de la matrice extracellulaire, à l'angiogénèse et à la réponse inflammatoire (Saiki et al, 1993; Pasqualini et al, 2000; Larsen et al, 1996). De plus, l'APN joue un rôle de récepteur pour certains virus tels que les coronavirus (Delmas et al, 1992) et les cytomégalovirus (Soderberg et al, 1993).

Son importance au niveau du métabolisme des kinines est reliée à sa capacité d'hydrolyser le résidu Lys en position amino-terminale de la KD et de la des-Arg<sup>10</sup>-KD; celui-ci constitue d'ailleurs le principal agoniste des récepteurs B1 (Moreau et al, 2005a). Il a d'ailleurs été démontré que l'APN correspondait à la voie de dégradation majeure pour la des-Arg<sup>10</sup>-KD dans l'artère ombilicale isolée chez l'humain (Pelorosso et al, 2005) et dans l'aorte de lapin (Fortin et al, 2005). De plus, une inhibition de l'APN par l'amastatin potentialise l'effet hypotenseur de l'agoniste

des récepteurs B1, la des-Arg<sup>10</sup>-KD, chez des lapins prétraités au lipopolysaccharide (LPS) (Drapeau et al, 2005).

### 6.1.6 Dipeptidyl peptidase IV

La dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV) est une protéase de type membranaire qui appartient à la famille des prolyloligopeptidases (EC 3.4.14.5) (Barret, 1996). Elle est identique à l'antigène CD26, molécule de costimulation dans l'activation des cellules T, ce qui explique pourquoi elle est également connue sous le terme *CD26*. Le gène de la DPPIV humaine est localisé au chromosome 2 locus 2q24.3 et contient environ 70 kb et 26 exons (Abbott et al, 1994). La DPPIV est composée de 766 acides aminés et possède un poids moléculaire de 110 kDa (Tanaka et al, 1992).

La DPPIV est exprimée par les lymphocytes T, où elle est régulée positivement après activation (Lambeir et al, 2003). Elle est également largement exprimée dans une variété de tissus, tels les vaisseaux sanguins, les reins, les intestins, le foie, le myocarde, les poumons, les fibroblastes, et de façon générale dans les cellules épithéliales et endothéliales; cette expression varie beaucoup entre les différents tissus. Une forme soluble est également présente dans le plasma et d'autres liquides corporels comme le liquide céphalorachidien et le liquide séminal.

L'action physiologique la plus importante de la DPPIV est la synthèse de certains peptides chez les mammifères. Elle clive sélectivement le dipeptide situé en position amino-terminale des peptides qui contiennent une proline ou une alanine en position 2 (Lambeir et al, 2003), et est donc impliquée, de façon secondaire, dans le métabolisme de la BK. En effet, elle dégrade le métabolite inactif BK<sub>[2-9]</sub> généré par l'APP, pour former le produit final BK<sub>[4-9]</sub>. La substance P constitue un autre substrat de la DPPIV (Grouzman et al, 2002). Outre son activité catalytique, la DPPIV intervient dans la régulation de l'adénosine déaminase (Schrader et al, 1990), la protéine gp120 du VIH (Valenzuela et al, 1997), les protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine et le collagène (Hanski et al, 1985), le récepteur CXCR4 des chimiokines (Herrera et al, 2001) et la tyrosine phosphatase CD45 (Ishii et al, 2001). Le rôle de la DPPIV/CD26 au sein du système immunitaire est une combinaison de son activité exopeptidique et son interaction avec différentes molécules (Tanaka et al, 1994).



La DPPIV jouerait également un rôle dans le développement du diabète puisqu'elle inhibe l'activité de plusieurs peptides impliqués dans le métabolisme du glucose (Lambeir et al, 2003). En effet, deux hormones qui stimulent la libération d'insuline via les cellules  $\beta$ -pancréatiques, appelées GLP-1 (*glucagon like peptide-1*) et GIP (*glucose-dependent insulintropic polypeptide*), seraient dégradées par la DPPIV, tandis que le glucagon, hormone hyperglycémiant, serait libéré par l'action de cette enzyme. Les inhibiteurs de la DPPIV s'avèrent donc un traitement prometteur pour lutter contre le diabète de type 2 et constituent maintenant un objectif principal de recherche.

L'activité de la DPPIV est plus faible chez les femmes et tend à diminuer avec l'âge (Lambeir et al, 2003). De plus, des bas niveaux de DPPIV surviennent fréquemment lors d'un statut immunitaire affaibli. Il a également été démontré que l'activité de la DPPIV dans le sérum était plus faible chez les patients hypertendus qui ont développés un angiooedème suite à la prise d'iECA (Lefebvre et al, 2002). Il apparaît donc intéressant d'étudier cette enzyme dans l'étude de la compréhension de la pathophysiologie de l'AO, d'où son importance dans ce mémoire.

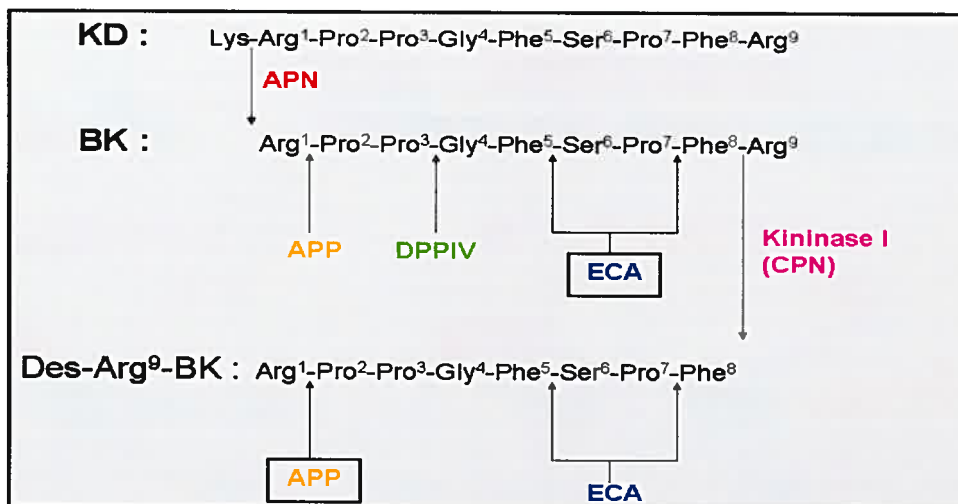
## **6.2 Métabolisme des kinines**

### **6.2.1 Méthodes d'investigation**

L'activité enzymatique des kininases dans le plasma peut être mesurée par différentes méthodes d'investigation spécifiques. L'activité de l'ECA est évaluée par la technique d'essai radioenzymatique (REA) à l'aide d'un substrat radioactif, la glycine-glycyl-[3H]-hyppuryl. L'activité de l'APP est mesurée par fluorimétrie grâce à un substrat spécifique, le K(Dnp)PPGK(Abz), tandis que celles de l'APN et de la DPPIV sont calculées par spectrophotométrie en absorption visible en fonction du temps avec un substrat spécifique pour chacun, soit H-Ala-para-nitroanilide (H-Ala-pNA) et Gly-Pro-pNA respectivement. L'activité de la CPN est mesurée par fluorimétrie avec le substrat dansyl-Ala. De plus, l'expression de ces kininases dans les tissus, spécifiquement l'APN et la DPPIV pour ce projet de mémoire, est évaluée en utilisant une nouvelle technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), soit le PCR en temps réel. Ces techniques seront décrites de façon détaillée dans la section « méthodologie ».

## 6.2.2 Métabolisme des kinines plasmatiques

Les différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des kinines, soit la KD, la BK et la des-Arg<sup>9</sup>-BK, ne possèdent pas la même activité enzymatique (voir figure 5). L'APN clive le résidu Lys en position amino-terminale de la KD pour former le nonapeptide de la BK. Dans un modèle expérimental, effectué au laboratoire (Décarie et al, 1996), il a été démontré que la BK est métabolisée principalement par trois métalloprotéinases. L'ECA joue le rôle majeur dans la dégradation de la BK, comptant pour 75% du métabolisme total. L'APP est responsable de 21,5% du métabolisme total de la BK. La kininase I (ou CPN) constitue une voie mineure de dégradation de la BK; ainsi il contribue à 3,5% du métabolisme total, à moins que l'ECA soit inhibée, formant le métabolite actif, la des-Arg<sup>9</sup>-BK. La DPPIV est faiblement impliquée dans le métabolisme de la BK, formant le peptide inactif BK<sub>[4-9]</sub> (Blais et al, 1999a). La des-Arg<sup>9</sup>-BK, par contre, est métabolisée principalement par deux enzymes, soit l'ECA et l'APP, la dernière constituant la voie de dégradation majeure avec 65% du métabolisme total (Blais et al, 1999a).



**Figure 5.** Contribution relative des principales peptidases plasmatiques impliquées dans le métabolisme de la KD, la BK et la des-Arg<sup>9</sup>-BK.

### 6.2.3 Métabolisme des kinines tissulaires

Le métabolisme des kinines a été étudié dans plusieurs types de cellules, telles que les cellules endothéliales (Graf et al, 1992) et les cellules de muscle lisse (Mentlein et Roos, 1996, Vaghy et al, 1995). Par exemple, le rôle de l'ECA, de l'EPN et des autres peptidases (APP, CPN) impliquées dans la dégradation de la BK au niveau de l'endothélium a été évalué dans des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines isolées (Graf et al, 1992). Dans cette étude, on a démontré que l'activité majeure était attribuée à l'ECA, suivie de l'EPN avec une proportion 4 : 1.

Le métabolisme des kinines a aussi été étudié dans d'autres tissus. Au niveau du poumon, la BK est dégradée principalement par l'ECA et l'APP qui comptent pour 50 et 30% du métabolisme total respectivement (Pesquero et al, 1992 ; Prechel et al, 1995). La DPPIV intervient également, mais à proportion plus faible dans le métabolisme de la BK. Au niveau du cœur, une étude menée à notre laboratoire a démontré que le temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de dégradation de la BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-BK dépendait de l'espèce étudiée, celle-ci étant plus courte chez les lapins comparativement aux chiens, rats et humains (Blais et al, 1997b). L'ECA était toutefois la principale enzyme impliquée dans la dégradation de la BK chez les quatre espèces étudiées, comptant pour 70% du métabolisme total chez l'humain et le chien, et pour 50% chez le rat et le lapin. Une autre étude menée par Dumoulin et collaborateurs a également permis d'évaluer les kininases responsables de la dégradation de la BK au niveau de l'endothélium coronarien de rat en utilisant un système de Langendorff (Dumoulin et al, 1998). Après une perfusion de BK à une concentration de 10 nM à travers le lit vasculaire du cœur, la proportion de BK immunoréactive mesurée était de 30% de la concentration initiale. Le pourcentage de BK était rétabli à 60% de sa concentration initiale suite à la coperfusion avec un iECA, l'enalaprilat, tandis qu'avec un inhibiteur d'EPN, le retrothiorphan, seulement une faible proportion de BK était restaurée. Toutefois, la perfusion combinée des deux inhibiteurs ramenait la concentration de BK à 81%. Le métabolite actif, la des-Arg<sup>9</sup>-BK, formé par la CPN n'était pas détecté après la perfusion. Ces résultats ont donc démontré qu'au niveau des vaisseaux coronaires de rats, l'ECA jouait un rôle majeur dans le métabolisme de la BK, suivi de l'EPN.

#### 6.2.4 Métabolisme des kinines urinaires

Une étude a été effectuée chez des chiens anesthésiés où on a administré de la BK par voie intraveineuse au niveau de l'artère rénale (Nasjletti et al, 1975). Après son passage dans le rein, le peptide était dégradé à une proportion d'environ 87%. La BK est donc largement métabolisée dans cet organe. Ogata et collaborateurs ont étudié les enzymes responsables de la dégradation de la BK au niveau rénal, et ont démontré que l'EPN était responsable de 59% du métabolisme, suivi de l'ECA et la CPN à 29% et 11% respectivement (Ogata et al, 1989).

Une autre étude a par la suite démontré que la BK était dégradée en  $BK_{[1-8]}$ ,  $BK_{[1-7]}$ ,  $BK_{[1-6]}$  et  $BK_{[1-5]}$ , et que les principales kininases contribuant au catabolisme de la BK urinaire étaient l'EPN et la carboxypeptidase Y (CPY)-like exopeptidase responsables de 35% et 38% de la dégradation totale de la BK respectivement (Saito et al, 1995). Toutefois, selon cette même étude, le pH de l'urine pourrait influencer l'activité de ces enzymes. En effet, à un pH de 5, la CPY-like exopeptidase contribuerait principalement au catabolisme de la BK, tandis qu'à un pH de 7, l'EPN constituerait la principale kininase impliquée au niveau du rein.

## 7. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

Les iECAs forment actuellement une classe de médicaments largement utilisés dans le traitement de plusieurs affections cardiovasculaires, principalement l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque. Les effets bénéfiques des iECAs furent d'abord attribués à l'inhibition de la formation de l'angiotensine II, un peptide vasoconstricteur puissant. Toutefois, maintenant que l'ECA est considérée comme étant une kininase plutôt qu'une angiotensinase, la BK est maintenant soupçonnée de jouer un rôle important dans les effets antihypertenseurs et cardioprotecteurs des iECAs.

### 7.1 Effets secondaires des iECAs

La toux chronique, qui survient chez 5 à 20% des patients sous traitement d'iECA, constitue l'effet secondaire le plus fréquent, et elle a été hypothétiquement associée à l'accumulation de BK endogène (Israili et Hall, 1992). L'utilisation de ces inhibiteurs se caractérise par des effets secondaires aigus rares, mais

potentiellement mortels : l'AO et les réactions d'hypersensibilité et d'hypotension sévères lors de transfusions sanguines et de dialyse rénale. Ce projet de maîtrise s'intéresse particulièrement à l'AO, qui survient chez 0,1 à 0,2% des patients traités aux iECAs. Plusieurs études, dont celles effectuées dans notre laboratoire, se sont penchées sur la compréhension de la physiopathologie de l'AO. Ainsi, Blais et collaborateurs ont caractérisé le métabolisme de la BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-BK dans le sérum de patients ayant eu des épisodes d'AO alors qu'ils prenaient un iECA (Blais et al, 1999b). Cette étude a démontré chez certains patients que lorsque le plasma était préincubé avec un iECA, la t<sub>1/2</sub> de la des-Arg<sup>9</sup>-BK était plus longue, mais pas celle de la BK. En 2002, une autre étude menée par Molinaro et collaborateurs a été effectuée sur l'AO associé à la prise d'iECA (Molinaro et al, 2002b). Ces auteurs ont analysé le métabolisme de la BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-BK endogènes en présence d'un iECA chez des patients souffrant d'hypertension et ayant présenté des épisodes d'AO (AO+). Les résultats ont été comparés à ceux d'un groupe témoin, c'est-à-dire des patients souffrant d'hypertension mais n'ayant présenté aucun effet secondaire associé à la prise d'iECA (AO-). Ils ont remarqué que la vitesse de dégradation de la des-Arg<sup>9</sup>-BK était plus lente dans le plasma des patients AO+ comparativement aux patients AO-. De plus, la t<sub>1/2</sub> de la des-Arg<sup>9</sup>-BK était significativement plus longue chez les patients AO+. Ils ont pu conclure qu'une anomalie dans la dégradation de la des-Arg<sup>9</sup>-BK endogène existe dans le plasma d'individus présentant des épisodes d'AO sous traitement d'un iECA, observation qui suggère que le mécanisme pathogène est relié au site catabolique du métabolisme des kinines. Une section complète de ce mémoire sera consacrée à la description de l'AO et le rôle de l'APP dans le développement de cette anomalie.

## **7.2 L'effet des iECAs sur l'expression des métalloprotéinases et des récepteurs des kinines au niveau oropharyngé**

Une étude menée dans notre laboratoire portant sur l'expression des métalloprotéinases et des récepteurs des kinines a permis d'évaluer chez des cochons l'effet des iECAs sur l'expression de certains composants du système kallibréines-kinines dans les tissus oropharyngés, siège d'une forme mortelle d'AO (Moreau et al, 2005b). Une nouvelle technique de PCR en temps réel fut développée afin d'effectuer une quantification relative de l'expression de l'EPN, l'APPm et les

récepteurs des kinines, B1 et B2, au niveau tissulaire, soit dans la langue, les glandes parotides, le tissu laryngé et rénal chez le porc. Les résultats de cette étude apportent des données supplémentaires quant à l'expression et l'activité des kininases dans les tissus oropharyngés chez le porc. Le traitement chronique mais non aigu d'iECA module l'expression de l'ARNm de l'EPN et de l'APP, mais l'activité de ces enzymes, ainsi que celle de l'ECA, était généralement stable dans les tissus. Le traitement chronique d'iECA régulait positivement l'ARNm des récepteurs B1 et B2 des tissus oropharyngés, et celui du récepteur B1 au niveau des cellules de l'endothélium vasculaire lingual. Suite à l'activation du système de contact dans le plasma, de plus grandes quantités de kinines immunoréactives, soit la BK et la des-Arg<sup>9</sup>-BK, étaient mesurées dans le plasma des cochons traités avec un iECA comparativement au plasma des animaux du groupe témoin ou ceux traités au LPS. Un des objectifs de ce mémoire sera de vérifier l'expression de l'APN, la DPPIV et la kallibréine glandulaire chez ces mêmes groupes de cochons afin d'étudier l'implication d'autres constituants du système kallibréines-kinines.

## II Les angiooedèmes

### 1. Définition

L'AO en absence d'allergie représente encore un paradoxe médical. Cette réaction inflammatoire locale se manifeste sous forme d'enflures aux niveaux facial, laryngé, génital, intra abdominal ou encore aux extrémités comme les pieds et les mains (Agostoni et al, 2004). L'AO représente un danger pour la vie si sa localisation implique l'arbre respiratoire supérieure, principalement le larynx, pouvant provoquer l'obstruction des voies aériennes.

En 1878, John Laws Milton fut le premier à définir les symptômes de l'AO, qu'il désigna comme « urticaire géant », chez 6 patients (Milton, 1876). Heinrich Quincke à son tour décrivit un œdème aigu et circonscrit au niveau de la peau (Quincke, 1882). En 1888, Sir William Osler distingua une forme héréditaire de l'AO qu'il désigna sous le nom d'œdème angioneurotique (Osler, 1888). Il fut également le premier à définir totalement les caractéristiques cliniques. Ensuite, 75 ans plus tard, Donaldson et Evans ont détecté des symptômes similaires chez des patients qui présentent une déficience (fonctionnement anormal) de l'inhibiteur du

premier composant du système du complément, le C1-INH (Donaldson et Evans, 1963). Au moment de leur publication en 1963, la nature de cette déficience était inconnue, et en utilisant leur technique d'immunoélectrophorèse permettant une évaluation semi-qualitative, ils ont observé que ces patients avaient un déficit en C1-INH. Depuis lors, plusieurs études ont été effectuées pour mieux comprendre les aspects génétiques et pathophysiologiques ainsi que la gestion clinique appropriée de l'AO de type non-allergène.

## 2. Classification

Il existe principalement deux types d'AO : l'angiooedème héréditaire (AOH) qui constitue une affection génétique au niveau du C1-INH, et l'angiooedème acquis (AOA) qui est caractérisé par la présence d'anticorps dirigés contre le C1-INH, ou par la prise de certains médicaments. Ces deux formes sont décrites de façon détaillée dans les prochaines sous-sections.

### 2.1 L'angiooedème héréditaire

L'AOH est une affection génétique à transmission autosomale dominante à forme hétérozygote exclusive (Davis, 2003). Ses variantes incluent le type I et le type II qui sont tous deux associés à des mutations du gène codant pour le C1-INH, localisé au chromosome 11 locus 11q12-q13.1. Dans 85% des cas d'AOH, le déficit est dû à une diminution de l'expression de C1-INH plasmatique, ce qui correspond dans ce cas-ci à un AOH de type I (quantitatif). Un seul allèle est alors altéré ce qui mène à des concentrations faibles en C1-INH fonctionnel et antigénique. Dans 15% des cas, les mutations provoquent une expression dysfonctionnelle de la glycoprotéine C1-INH, correspondant alors à l'AO de type II (qualitatif) (Davis, 2003). La prévalence mondiale de l'AOH se situerait à environ 1/10 000 à 1/50 000 (Agostoni et Cicardi, 1992).

Comme il a été mentionné précédemment, le C1-INH représente le seul inhibiteur *in vivo* du premier composant de la cascade du complément, et est un facteur important pour l'inactivation du système de contact du plasma via l'inhibition du facteur XII et de la kallibréine (Davis, 2003). Le C1-INH agit également sur le système fibrinolytique en bloquant l'activité de la plasmine (Harpel et Cooper, 1975). Il a été démontré que ces deux systèmes étaient instables chez des patients

déficients en C1-INH (Landerman et al, 1962; Nilsson et Back, 1985). En effet, une activation non contrôlée du système de contact permet d'initier la cascade qui produit de la BK, d'où une augmentation de la perméabilité vasculaire et la manifestation d'un AO (Davis, 2003). Différentes études ont d'ailleurs prouvé que l'activation du système de contact se produisait effectivement durant une crise d'AO (Schapira et al, 1983; Curd et al, 1980; Fields et al, 1983).

Selon une étude expérimentale *in vitro*, l'activation du système fibrinolytique avec génération de plasmine, observée durant une crise aiguë d'AO de forme héréditaire (Cugno et al, 1993), potentialiserait la production de BK par l'hydrolyse du KHPM par la kallibréine (Kleniewski et al, 1992). Ainsi, les agents antifibrinolytiques sont parfois utiles pour traiter les AO causés par une déficience en C1-INH. De plus, Davis a démontré que chez la souris présentant une anomalie pour le gène du C1-INH, l'augmentation de la perméabilité vasculaire est renversée par trois traitements, soit le C1-INH lui-même, le DX88 qui est un inhibiteur de la kallibréine plasmatique, ou le Hoe140 qui constitue un antagoniste des récepteurs B2 (Davis, 2003). De plus, la perméabilité vasculaire n'était pas accrue chez les souris présentant une anomalie à la fois pour le C1-INH et les récepteurs B2. Selon ces différents résultats, il apparaît donc évident que la BK joue un rôle important dans la physiopathologie de l'AOH.

## 2.2 L'angiooedème acquis

L'AO causé par une déficience acquise de C1-INH, référée à l'AOA, fut d'abord décrite par Caldwell et collaborateurs (Caldwell et al, 1972). Les manifestations cliniques de l'AOA s'apparentent à celles de l'AOH et ses caractéristiques sont la déplétion en C1-INH ainsi que l'activation incontrôlée de la voie classique du système du complément (Melamed et al, 1986). En conséquence, les patients développant des crises d'AO de nature acquise ont des niveaux ou des activités presque indétectables en C1-INH, C4, C2, C1q, C1s et C1r.

Il existe principalement cinq formes d'AOA : associé à un désordre lymphoprolifératif avec consommation du C1-INH (Kaplan, 2001), associé à un déficit autoimmunitaire (Kaplan, 2001), de nature médicamenteuse secondaire à la prise d'oestrogènes (Binkley et Davis, 2000) ou de certains médicaments anti-hypertenseurs, comme les iECAs (Sigler et al, 1997), et enfin de nature idiopathique.



### **2.2.1 L'angioedème associé à un désordre lymphoprolifératif avec consommation du C1-INH**

Cette forme d'AO fut décrite chez des patients ayant présenté un lymphome et qui présentaient des niveaux faibles d'IgM et de C1-INH (Kaplan et Greaves, 2005). La déplétion des niveaux de C1-INH pourrait être causée secondairement par la présence de complexes immuns ou l'interaction entre le composant C1 avec un antigène de la surface d'une cellule tumorale (Caldwell et al, 1972 ; Hauptmann et al, 1976 ; Schreiber et al, 1976). Par exemple, pour le lymphome des cellules B, qui correspond au type de lymphome malin le plus commun, la fixation du C1 et la diminution des niveaux de C1-INH sont causées par un anticorps lié à l'immunoglobuline présente à la surface des cellules B (Geha et al, 1985).

### **2.2.2 L'angioedème associé à un désordre autoimmun**

En 1986, des autoanticorps dirigés contre le C1-INH et altérant la fonction de celui-ci, furent détectés pour la première fois chez des patients manifestant des crises d'AOA (Jackson et al, 1986). Même si le mécanisme exact impliqué dans cette anomalie demeure controversé, ces autoanticorps semblent accroître le clivage du C1-INH via l'action de protéases cibles, ceci provoquant alors une activation non contrôlée du système du complément et une libération de kinines par le système de contact (Malbran et al, 1988 ; Jackson et al, 1989 ; He et al, 1998).

### **2.2.3 L'angioedème associé à la prise d'oestrogènes**

Les épisodes d'AO associés à la prise d'oestrogènes (AOO) sont cliniquement semblables à ceux observés dans les manifestations d'AOH, à la différence que ces épisodes apparaissent seulement lors d'une grossesse ou lors d'usage d'oestrogènes exogènes, tels que la prise de contraceptifs oraux ou d'une substitution hormonale (Binkley et Davis, 2000). L'étude de ce type d'AO a pu être possible grâce à la découverte d'une famille dont certains membres féminins ont développés des crises d'AO en présence de fortes concentrations d'oestrogènes uniquement (Binkley et Davis, 2000). Ces femmes, faisant partie de trois générations, présentaient des symptômes identiques à ceux de l'AOH se manifestant entre 14 à 21 jours après la conception jusqu'à l'accouchement, ou encore entre 7 à

14 jours après l'usage de contraceptifs oraux ou d'oestrogènes dans une thérapie de substitution hormonale. Les niveaux de C1-INH, C4, pré-kallicréine, facteur XII et de KHPM, ainsi que la fonction du C1-INH ont été analysés durant les périodes asymptomatiques où les niveaux d'oestrogènes demeuraient stables; ils étaient tous normaux.

Cette même équipe de recherche a mené d'autres investigations portant sur l'étude des hormones sexuelles afin de comprendre leur lien avec le développement d'une crise d'AO (Binkley et Davis, 2000). Les hormones sexuelles, comme les oestrogènes et les androgènes, influencent la concentration de C1-INH et ont des effets opposés sur l'expression de cette protéine. En effet, les androgènes augmentent les niveaux de C1-INH, réduisant les attaques d'AO. Ils constituent alors une thérapie pour ces patients; le Danatrol® en est un exemple. Sachant que le gène du C1-INH peut contenir des mutations, la région régulatrice en 5' ainsi que les exons du gène du C1-INH ont été séquencés afin de découvrir une mutation qui pourrait altérer l'élément de réponse aux androgènes. Ils n'ont pourtant trouvé aucune anomalie ni dans la région régulatrice en 5', ni dans les séquences codantes du gène C1-INH chez les personnes affectées (Binkley et Davis, 2000). La région en 5' du gène du facteur XII, qui contient un élément de réponse aux oestrogènes, fut également séquencée, mais aucune anomalie ne fut identifiée.

Une autre étude, réalisée par Bork et collaborateurs, fut effectuée auprès de 36 patientes ayant présenté des épisodes d'AO avec des symptômes semblables (Bork et al, 2000). Ces femmes étaient réparties sur dix familles, leur âge variait et les attaques se manifestaient de façon irrégulière. Chez dix de ces patientes, les crises survenaient plus fréquemment lors de la prise de contraceptifs oraux et une patiente présentait des symptômes d'AO seulement lors d'une grossesse. Les niveaux de C1-INH et de C4 étaient normaux autant lors de crises que lors des périodes asymptomatiques.

Bien qu'il a été démontré que les oestrogènes augmentent l'expression du facteur XII de la voie de la coagulation (Gordon et al, 1980 et 1988; Jespersen et Klufft, 1985; Farsetti et al, 1995), ainsi que de la prékallicréine (Fossum et al, 1994), la nature exacte de l'AO n'est toujours pas élucidée à ce jour. Toutefois, les enzymes impliquées dans la dégradation des kinines, particulièrement l'APP, possèdent encore un rôle prépondérant dans la physiopathologie de l'AO. Ceci est expliqué en détail dans la section suivante.

#### 2.2.4 L'angiooedème associé à la prise d'iECA

En ce qui a trait à l'AO associé à la prise d'iECA, plusieurs travaux de recherche ont permis de mieux comprendre le mécanisme impliqué dans cette manifestation pathologique. Les symptômes cliniques de ce type d'AO sont associés à des concentrations élevées de kinines dans le plasma. Toutefois, on n'a observé aucune augmentation de l'hydrolyse du précurseur de la BK, le KHPM, contrairement aux formes héréditaires d'AO (Nussberger et al, 1998 ; Cugno et al, 2003).

Des travaux effectués à notre laboratoire ont permis de prouver que la diminution du métabolisme de la BK était une cause plus probable qu'une augmentation de la synthèse de la BK lors de crises d'AO associés à la prise d'iECA. Une première étude a démontré qu'une anomalie enzymatique reliée au catabolisme de la des-Arg<sup>9</sup>-BK était détectée chez la moitié des patients ayant développé des crises d'AO survenus par la prise d'iECA (Blais et al, 1999b). Il a ensuite été établi chez ce même type de patients que l'activité de l'APP dans le plasma était significativement plus faible ce qui est associé à une diminution notoire de la dégradation de la des-Arg<sup>9</sup>-BK (Adam et al, 2002; Molinaro et al, 2002b). La conclusion de ces études porte à croire que les individus ayant une faible activité d'APP seraient prédisposés à développer des épisodes d'AO lors d'un traitement d'iECA, étant donné que cette kininase joue le rôle capital dans le catabolisme de la BK lorsque l'ECA est inhibée.

Une étude a identifié un génotype important au niveau du gène XPNPEP2, localisé au chromosome 10q25.1 (Sprinkle et al, 2000) et qui code pour l'APPm. Ce génotype serait impliqué de façon majeure dans le contrôle de l'activité de l'APP (Duan et al, 2005). Une mutation a été détectée au niveau d'un nucléotide à la position -2399 du gène (C-2399A SNP). Un criblage de ce gène fut effectué chez des patients avec des antécédents d'AO par prise d'iECA (20 patients). Comparativement à des individus sains, l'étude a démontré une association entre cette mutation et le déclenchement de crises d'AO (Duan et al, 2005). Cette découverte prouve qu'une mutation du gène de l'APPm est associée à une diminution de l'activité de l'APP et à une plus forte incidence à développer un AO par prise d'iECA chez certains individus.

### **2.2.5 L'angioedème idiopathique**

Dans une récente étude, Cicardi et collaborateurs ont décrit les symptômes de patients ayant développé des épisodes d'AO, mais ayant des concentrations normales des différents composants du système du complément, n'ayant pas d'antécédant d'AO suite à la prise de certains médicaments et dont les symptômes ne pouvaient être traités par l'administration d'antihistaminique (Cicardi et al, 1999). Leurs symptômes ressemblaient toutefois à ceux des patients angioedémateux qui ont des anomalies pour le C1-INH. On considère maintenant ces patients comme faisant partie du sous-groupe « AO idiopathique non-histaminique », dont la nature demeure inconnue à ce jour (Agostoni et al, 2004).

## **BUTS DU TRAVAIL**

Ce projet de maîtrise s'inscrit dans le contexte des travaux consacrés à l'étude du rôle des kinines dans la physiopathologie des différents types d'AO. En utilisant l'expertise et les méthodes analytiques appropriées, trois principaux aspects seront traités afin de mieux comprendre cette affection :

**1- Le rôle des kinines plasmatiques dans les AO acquis associés à la prise d'oestrogènes.** Nous définirons le métabolisme des kinines dans des échantillons de plasma prélevés chez des patientes ayant présenté des épisodes d'AO lors de la prise de la pilule contraceptive. Pour ce faire, nous appliquerons une méthode développée à notre laboratoire et nous compléterons cette approche par le dosage de différentes peptidases impliquées dans le métabolisme des kinines, à savoir l'ECA, l'APP, la CPN, la DPPIV et l'APN.

**2- L'implication des kinines urinaires chez des patients ayant présenté des épisodes d'AO de nature idiopathique.** Les investigations au niveau plasmatique seront complétées par le dosage des kinines dans des échantillons d'urine prélevés suite à un épisode aigu d'AO. La caractérisation des différentes kinines sera effectuée grâce à la technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et sera comparée aux kinines présentes dans les urines d'un groupe témoin.

**3- La mesure de l'expression de certains constituants du système kallicroïnes-kinines au niveau du tissu oropharyngé chez le porc.** En parallèle, nous développerons une approche par PCR en temps réel pour le dosage de l'ARNm de l'APN, la DPPIV et de la kallicroïne glandulaire dans les tissus oropharyngés de porcs, siège de l'AO.

**Nous croyons pouvoir apporter des éléments nouveaux quant à la compréhension de la physiopathologie de l'AO, particulièrement le rôle des kinines et leur métabolisme tant aux niveaux plasmatique, urinaire et tissulaire.**

# MÉTHODOLOGIE

## Matériel et réactifs

La BK et la des-Arg<sup>9</sup>-BK ont été obtenues chez Peninsula Laboratories (Belmont, CA, USA). La dansyl-Ala, l'o-phénylènediamine, le Tween 20, le DMSO et le peroxyde d'urée proviennent de Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Les substrats Gly-Pro-pNA pour la DPPIV et H-Ala-pNA pour l'APN proviennent de Bachem California Inc. (Torrance, CA, USA). L'éthanol anhydre de pureté HPLC a été acheté d'American Chemicals (Montréal, QC, Canada). L'eau purifiée déionisée a été obtenue de la compagnie Les eaux Saint-Léger (Boucherville, QC, Canada). Les plaques de 96 puits proviennent de Corning Incorporated (Corning, NY, USA). L'acide trifluoroacétique (TFA) a été obtenu chez Pierce (Rockford, IL, USA). Les amorces de PCR ont été synthétisées par Biocorp Inc. (Montréal, QC, Canada). Tous les autres réactifs, tels que l'acétonitrile de pureté HPLC, proviennent de Fisher Scientific (Montréal, QC, Canada), à moins d'indication contraire.

## **I Rôle des kinines dans les angioedèmes acquis induits par les oestrogènes**

Le projet a été autorisé par les comités d'éthique de l'Université de Grenoble et de l'Université de Montréal.

### **1. Échantillons de plasma**

#### **1.1 Angioedème associé à la prise d'oestrogènes**

Les échantillons sanguins ont été prélevés à 44 patientes atteintes d'AO associé à la prise d'oestrogènes (AOO) à titre contraceptif. Une première prise de sang a été effectuée au moment de l'épisode d'AO, et une deuxième trois semaines après avoir cessé la prise du médicament anovulatoire. Des échantillons de plasma citraté nous ont été fournis par le Dr. Christian Drouet du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Grenoble. Les patientes ont fournis un consentement libre et

éclairé et leur confidentialité a été maintenue. Le plasma a été conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans des tubes de polypropylène jusqu'au moment des mesures biochimiques.

## 1.2 Angioedème héréditaire de type I

Des échantillons de plasma citraté ont été obtenus chez des patientes ( $n=32$ ) atteintes d'AO héréditaire de type I traitées ( $n=18$ ) ou non ( $n=14$ ) par Danatrol<sup>®</sup>. Ces échantillons nous ont également été fournis par le Dr. Christian Drouet sous les mêmes conditions telles que décrites dans la section 1.1.

## 2 Métabolisme des kinines exogènes

### 2.1 Incubation

Un volume de 350  $\mu\text{l}$  de plasma a été incubé avec 3,5  $\mu\text{l}$  de BK exogène à une concentration finale de 471 nM à  $37^{\circ}\text{C}$  avec agitation. Des aliquots de 25  $\mu\text{l}$  de plasma ont été prélevés à différents temps d'incubation, soit 0, 40, 60, 80, 100, 120, 180, 300, 420, 540 et 720 secondes. Deux millilitres d'une solution d'éthanol anhydre à une concentration finale de 80% (v/v) ont été ajoutés pour arrêter la réaction. Les échantillons ont été gardés à  $4^{\circ}\text{C}$  pour assurer la précipitation des protéines, puis centrifugés ( $4^{\circ}\text{C}$ , 15 minutes, 1750 x g). Le surnageant a ensuite été décanté et évaporé à sec dans un Speed Vac (Savant, Farmingdale, NY, USA). Les culots ont été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cette méthode a été développée et validée précédemment (Cyr et al, 2001).

### 2.2 Quantification des kinines

Les culots des extraits éthanoliques évaporés ont été remis en solution dans un tampon d'incubation (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,05% v/v, pH 7,4). Les kinines BK et des-Arg<sup>9</sup>-BK ont été dosées en employant deux techniques d'immunoessais compétitifs précédemment décrites et validées (Décarie et al, 1994 ; Raymond et al, 1995). Ces techniques utilisent des immunoglobulines G (IgGs) polyclonales de lapin hautement spécifiques à la partie carboxy-terminale de la BK ou de la des-Arg<sup>9</sup>-BK, ainsi qu'un traceur non radioactif qui consiste en BK ou des-

Arg<sup>9</sup>-BK couplée à la digoxigenin-3-0-methylcarboxyl-ε-aminocaproic-acid-N-hydroxysuccinimide ester (DIG-OSu).

Des plaques de 96 puits étaient recouvertes d'IgGs anti-BK ou anti-des-Arg<sup>9</sup>-BK (100 ng/puits) dans un tampon de fixation (bicarbonate 100 mM, pH 9,5) et incubées pendant toute une nuit à 4°C. Après 5 lavages effectués pour éliminer les IgGs non fixées, les plaques étaient saturées avec le tampon d'incubation pendant 2 heures à 37°C. Après une autre étape de lavages, la réaction de compétition était effectuée. Elle consiste en une compétition de BK/des-Arg<sup>9</sup>-BK de la courbe de calibration ou de l'échantillon avec son traceur respectif pour les anticorps fixés sur le support solide. Après une incubation de 18 heures à 4°C et une autre série de lavages, les complexes immuns (Ac-BK-DIG ou Ac-des-Arg<sup>9</sup>-BK-DIG) réagissaient avec des fragments Fab anti-digoxigénine couplé à la peroxydase de Raifort (HRPO), et ce pendant 2 heures d'incubation à 37°C. Après une dernière étape de lavages, l'activité enzymatique de HGPRO était mesurée avec une solution d'orthophénylènediamine (1 mg/ml) dans un tampon citrate (citrate de sodium 50 mM, acide citrique 30 mM, peroxyde d'urée 0,1% p/v, pH 5,0). Pour chaque puit, l'absorbance était mesurée à 450 nm avec une longueur d'onde de référence à 630nm (Bio-Tek Instrument, Winooski, VT, USA).

### 2.3 Calcul de la demi-vie des kinines

La constante (k) d'hydrolyse des kinines (S) était obtenue par une équation de premier ordre  $S = S_0 e^{-kt}$ . La demi-vie était calculée selon l'équation  $t_{1/2} = \ln(2)/k$  (Moore et Pearson, 1981).

## 3 Dosage des métallopeptidases plasmatiques

### 3.1 Aminopeptidase P (APP)

L'activité de l'APP est mesurée en fonction du temps dans des plaques de 96 puits (Costar UV plate 3635; Corning, Corning, NY, USA). La technique utilisée a été développée récemment à notre laboratoire par Molinaro et collaborateurs (Molinaro et al, 2005). Le substrat utilisé est un peptide à fluorescence quenchée, le K(Dnp)PPGK(Abz), dissout dans du DMSO 100%, pour obtenir une concentration finale de 10 mM et conservé à -20°C. Un volume de 10 µl de plasma et 125 µl de



tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique, 100 mM, pH 7,4) est disposé et incubé pendant 15 minutes à 37°C. Quinze µl de substrat préalablement incubé à 37°C sont alors ajoutés à chaque puit. L'intensité de la fluorescence émise est lue en fonction du temps (longueur d'onde d'excitation : 340 nm, longueur d'onde d'émission : 420 nm) par un lecteur de plaque (FL600 microplate fluorescence plate reader; BioTek, Winooski, VT, USA). Une unité d'activité enzymatique correspond à une pmol de K(Dnp)PPGK(Abz) hydrolyzé par minute et par millilitre de plasma.

### 3.2 Enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA)

L'activité de l'ECA a été quantifiée au moyen d'une méthode radioenzymatique (Angiotensin-Converting Enzyme <sup>3</sup>H-REA, ALPCO, Windham, NH, USA) en suivant les instructions du manufacturier. Cette technique mesure l'hydrolyse d'un substrat synthétique, le glycine-glycyl-[<sup>3</sup>H]-hyppuryl, en acide [<sup>3</sup>H]-hippurique et en dipeptide glycyl-glycine. Le solvant d'extraction sépare l'acide [<sup>3</sup>H]-hippurique du substrat n'ayant pas réagi. La radioactivité de l'acide [<sup>3</sup>H]-hippurique est mesurée par scintillation dans un compteur bêta. L'activité de l'ECA est exprimée en unités ECA. Une unité ECA correspond à la libération d'un nmol d'acide [<sup>3</sup>H]-hippurique/min/ml de plasma.

### 3.3 Carboxypeptidase N (CPN)

L'activité de la CPN a aussi été déterminée par fluorescence en employant une version modifiée (Blais et al, 1999a) de la technique décrite précédemment par Skidgel (Skidgel, 1995). Un volume de 20 µl de plasma est incubé à 37°C pendant 70 minutes avec une solution de dansyl-Ala-Arg à une concentration finale de 0,2 mM dans un tampon HEPES 0,1 M à un pH de 7,4, le volume total étant de 250 µl. La réaction est arrêtée en ajoutant 150 µl d'un tampon citrate (acide citrique 1 M, pH 3,1). Le dansyl-Ala libéré est ensuite extrait avec un volume de 3 ml de chloroforme. Après centrifugation (15°C, 10 minutes, 200 x g), la phase aqueuse est éliminée et la fluorescence de la phase chloroformique est mesurée à une longueur d'onde de 490 nm (longueur d'onde d'excitation : 340 nm). Une unité enzymatique de CPN correspond à une nmol de dansyl-Ala libéré/min/ml de plasma.

### 3.4 Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV)

Une méthode spectrophotométrique en fonction du temps a été utilisée pour mesurer l'activité de la DPPIV. Vingt  $\mu\text{l}$  de plasma sont préincubés avec 130  $\mu\text{l}$  de tampon Tris-HCl (50 mM, pH 8,3) dans les puits d'une plaque de 96 puits (Nunc-Immuno Plate Poly Sorp<sup>TM</sup>, Corning) pendant 15 minutes à 37°C. Cinquante  $\mu\text{l}$  de substrat Gly-Pro-pNA (2 mM), préincubé à 37°C, sont alors ajoutés dans chaque puit. L'absorbance est mesurée à 405 nm en fonction du temps (Bio-Tek Instrument, Winooski, VT, USA), toutes les 5 minutes pendant 30 minutes à 37°C. Une unité d'activité DPPIV correspond à une nmol de substrat hydrolysé/ml/min.

### 3.5 Aminopeptidase N (APN)

L'activité de l'APN est mesurée par une méthode similaire à celle de la DPPIV (section 3.4). Vingt  $\mu\text{l}$  de plasma ajoutés à 130  $\mu\text{l}$  de tampon PBS (phosphate buffer saline, pH physiologique) dans des plaques de 96 puits (idem DPPIV) sont incubés avec 50  $\mu\text{l}$  de substrat H-Ala-pNA à une concentration de 5 mM, à 37°C. L'absorbance est mesurée en fonction du temps à 405 nm (Bio-Tek Instrument, Winooski, VT, USA). Une unité enzymatique d'APN correspond à une nmol de substrat hydrolysé/ml/min.

## 4. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée par le Professeur Yves Lepage du département de Mathématiques et de statistique. La moyenne et l'erreur standard moyenne ont été calculées pour les différents paramètres mesurés (activité enzymatique de l'APP, DPPIV, ECA, CPN et l'APN ainsi que pour la  $t_{1/2}$  de BK et de des-Arg<sup>9</sup>-BK). Une analyse de variance à un facteur groupe à trois niveaux a permis d'évaluer l'effet du contraceptif sur ces moyennes à l'intérieur du groupe AOO. Une approche identique a été utilisée pour comparer le groupe AOO avec arrêt du médicament et les patientes atteintes d'AOH. Lorsque l'analyse de variance révélait une différence significative entre la moyenne des groupes ( $p < 0,05$ ), des contrastes de Tukey permettaient d'identifier entre quels groupes se situait la différence.

## **II Analyse des kinines urinaires chez les patients ayant développé un épisode d'angioedème de nature idiopathique**

### **1. Échantillons d'urine**

Les échantillons ont été fournis par le Dr. Christian Drouet du CHU de Grenoble. L'urine de patients angioedémateux a été récoltée dans le décours d'un épisode d'AO sur une solution d'acide chloridrique (HCl 6N) afin de maintenir un pH inférieur à 2.0. Après centrifugation, les échantillons urinaires ont été conservés à -80°C jusqu'au moment des mesures biochimiques.

Des échantillons d'urine ont également été obtenus d'un groupe de 10 hommes et 10 femmes n'ayant pas connu d'épisodes d'AO. Ceux-ci ont été récoltés et conservés dans des conditions identiques.

### **2 Purification des kinines urinaires par chromatographie hydrophobe**

Un ml d'urine fut purifié à l'aide une colonne de Sep-Pak Vac C8 (125 ´, Water Corporation, Milford, MA, USA) équilibrée dans le TFA 0,1%. Après deux lavages successifs avec 3 ml de TFA 0,1% et 3 ml d'une solution d'acétonitrile 10% dans le TFA 0,1%, les kinines ont été éluées par une solution contenant 40% d'acétonitrile dans le TFA 0,1%. Les échantillons ont alors été évaporés à sec dans un Speed Vac (Savant, Farmingdale, NY, USA).

### **3 Dosage des kinines urinaires**

Le dosage des kinines a pu être effectué en suivant la technique précédemment décrite à la section 2.2. Les concentrations des kinines urinaires sont corrigées par rapport à la concentration de créatinine.

## 4 Caractérisation des kinines immunoréactives par HPLC

Les extraits secs contenant des kinines immunoréactives sont remis en suspension dans 200 µl d'une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 mM, pH 3,0) et 25% d'acétonitrile avec 1% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . La séparation sur HPLC des différentes kinines est réalisée au moyen d'un système Agilent 1100 Series (Agilent Technologies Canada, Mississauga, Canada) à l'aide d'une colonne de 2-sulfoéthyl aspartatim (PolySULFOETHYL A TM, The Nest Group inc, Southboro, MA) en utilisant un gradient de KCL (0 à 300 mM) dans une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 mM, pH 3,0) et 25% d'acétonitrile (v/v) pendant 30 minutes à un débit de 1 ml/min. Les fractions éluées sont collectées et évaporées au Speed Vac avant la quantification des kinines immunoréactives comme décrit sous la section 2.2.

## III Régulation de l'expression de certains constituants du système kallibréines-kinines au niveau du tissu oropharyngé chez le porc

Cette partie du projet constitue la suite d'une étude effectuée à notre laboratoire par Marie Eve Moreau et collaborateurs (Moreau et al, 2005b). Au moment de ce projet de maîtrise, les tissus d'animaux avaient préalablement été prélevés et conservés à  $-80^\circ\text{C}$  dans du RNA Later (Ambion, Austin, TX, USA). Toutefois, à des fins de compréhension, nous décrivons le modèle animal utilisé.

### 1 Modèle animal

Des cochons mâles au nombre de 24, provenant d'une espèce croisée (Yorkshire x Landrace), âgés d'environ deux mois et pesant  $16,1 \pm 1,6$  kg provenaient d'une ferme dépourvue d'agents pathogènes spécifiques. Ils étaient gardés dans une pièce isolée.

Le protocole expérimental a été approuvé par le comité d'éthique de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Les 24 animaux étaient séparés aléatoirement dans 4 groupes différents : (i) un groupe ayant reçu une seule injection d'iECA (injection intraveineuse de 100 µg/kg d'enalaprilat) aussi appelé groupe aigu; (ii) un groupe ayant reçu une administration d'iECA sur une période de 7 jours (comprimé d'enalapril 20 mg administré oralement à toutes les 12 heures),

aussi appelé groupe chronique; (iii) un groupe ayant reçu une injection de LPS provenant d'une souche d'*Escherichia coli* (sérotype O111:B4 ; une seule dose intraveineuse de 5µg/kg dissout dans 1ml de NaCl 0,9%); et (iv) un groupe d'animaux n'ayant reçu aucune administration, ou groupe témoin. À la fin des expérimentations, tous les animaux étaient euthanasiés par une injection létale intraveineuse de pentobarbital sodique (540 mg/ml). Le groupe aigu a été euthanasié 4 heures après l'injection d'enalaprilat, le groupe chronique l'a été le matin du 8<sup>ième</sup> jour et les animaux administrés au LPS ont été sacrifiés 6 heures après l'injection de LPS. Deux cochons du groupe témoin furent euthanasiés au même moment pour chaque groupe d'animaux ayant reçu une administration soit d'iECA ou de LPS.

## 2 Isolation de l'ARN des tissus

L'ARN total a été isolé de la langue et du tissu rénal en employant le réactif TRIzol ainsi qu'un kit RNAqueous<sup>®</sup>-4PCR (Ambion, Austin, TX, USA) selon les instructions du fabricant et comme décrit précédemment (Moreau et al, 2005b). Environ 50 mg de chaque tissu fut homogénéisé dans 1 ml de TRIzol. Un volume de 200 µl de chloroforme était alors ajouté aux échantillons pour extraire les lipides. Après centrifugation, la phase aqueuse était récupérée et 250 µl d'une solution « lysis-binding » fournie dans le kit RNAqueous<sup>®</sup>-4PCR étaient ajoutés selon le protocole du fabricant. Après une étape de lavage et l'ajout de 50 µl d'une solution d'éluion, un microlitre d'une solution de DNase I était ajouté aux échantillons d'ARN dans le but d'éliminer toute trace d'ADN génomique. Les échantillons d'ARN étaient ensuite incubés, centrifugés et conservés à -80°C.

## 3 Transcription inverse (RT) et Réaction de polymérase en chaîne en temps réel (RT-PCR)

La quantité totale d'ARN, soit environ 0,5 µg, a été transcrite en ADN complémentaire (ADNc) en utilisant 50 U de transcriptase inverse (Virus de leucémie Moloney-murine, Applied Biosystems, Foster City, CA) et 5 µM d'oligo(dT)16 comme amorce. La quantification de l'ARN transcrite en ADNc a été effectuée par PCR en temps réel utilisant l'appareil LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) où 2 µl d'ADNc sont portés à un volume final de

20 µl avec une solution contenant du MgCl<sub>2</sub> (2 mM), des amorces (concentration finale : 0,7 µM) (voir tableau 2), 2 µl de SYBR-Green (LightCycler-FastStart DNA SYBRGreen I Mix, Roche Diagnosis) et de l'eau. Après l'activation de l'ADN polymérase à 95°C pendant 10 minutes, les conditions d'amplification suivantes sont appliquées : 47 cycles, chacun étant constitué de trois étapes : la dénaturation (95°C, 15 s), l'hybridation (62°C, 5 s) pour le gène de référence (glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase, GAPDH) et la DPPIV (langue), (55°C, 5 s) pour l'APN, la DPPIV (rein) et la KG, et l'élongation (72°C). Le temps d'élongation est calculé selon la longueur de l'amplicon (paires de base/25). L'acquisition de la fluorescence est donnée à la fin de chaque étape d'élongation. Suite aux cycles d'amplification, une courbe de fusion est donnée par une acquisition de fluorescence continue, de 65 à 98°C. Cette étape permet de valider la spécificité de nos produits de PCR par la visualisation de cette courbe donnée par le logiciel. Des courbes standard furent effectuées pour chacun des amorces pour la quantification relative des produits spécifiques de PCR. L'efficacité de la réaction (E) correspondant à la phase exponentielle d'un cycle fut calculée par le logiciel de l'appareil selon l'équation :

$$E = 10[-1/\text{pente}] \text{ (Pfaffl, 2001).}$$

Gènes	Séquences nucléotidiques (5'→3')	Longueur du de l'amplicon (pb)
<b>GAPDH</b>	F834: ACT TCG GCA TCG TGG AAG GAC T R1334: GGT CCA GGG GCT CTT ACT CCT T	500
<b>APN</b>	F1783: TGG ATT GTT CCC ATC TCA TCT ATT AAA R1954: TCC AGT TGT CCT CGT CG	172
<b>DPPIV</b>	F1130: ATG AAG AGG GCT ACA AAC AC R1291: GAT TTC TTC CTC CTG GCA T	162
<b>KG</b>	F533: TCA CTC TCC TGC AGA ATA CG R682: TCC CTT GCC ACA TAC CG	150

**Tableau 2. Séquences nucléotidiques des amorces sens et antisens (forward (F) et reverse(R)).**

## 4 Quantification relative

La quantification relative de l'expression de gènes cibles (APN, DPPIV et KG) fut effectuée au moyen du modèle mathématique présenté ci-dessous (Pfaffl, 2001) qui évalue l'efficacité de la réaction de PCR du transcrite cible et de la déviation du « crossing point » (Cp), calculé selon la méthode de seconde dérivée, d'un témoin et d'un échantillon inconnu normalisé par le transcrite de référence. Le ratio calculé selon cette équation détermine la quantification relative d'un gène d'intérêt comparé à un gène de référence.

$$\text{Log Ratio Normalisé} = \frac{E_R^{CpR(s)}}{E_T^{CpT(s)}}$$

Dans cette équation, E représente l'efficacité de la réaction; R correspond au gène de référence; CpR est le « crossing point » du gène de référence; S représente l'échantillon de tissu; T correspond au gène d'intérêt; et CpT est le « crossing point » du gène d'intérêt. Une transformation logarithmique est appliquée au ratio normalisé afin de stabiliser les variances.

## PRÉSENTATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS

### I Métabolisme des kinines dans les angioedèmes chez des patientes ayant développé des crises d'AO associées à la prise de contraceptifs oraux

#### 1. Peptidases plasmatiques impliquées dans le métabolisme des kinines

L'activité enzymatique des différentes peptidases responsables du métabolisme des kinines a été mesurée dans le plasma des patientes ayant présenté des crises d'AO pendant la prise de contraceptifs oraux à 2 moments différents : période où le médicament était administré (groupe œstrogènes +, n = 40) et après un sevrage de 3 semaines de la contraception orale (groupe œstrogène -, n = 36). Tel qu'illustré à la figure 6, aucune différence significative n'a pu être mesurée entre les deux groupes pour l'ECA ( $35 \pm 2$  vs  $37 \pm 2$  unités,  $p= 0,66$ ), la CPN ( $69 \pm 2$  vs  $63 \pm 3$  unités,  $p= 0,858$ ), la DPPIV ( $20 \pm 1$  vs  $21 \pm 1$  unités,  $p= 0,284$ ) et l'APN ( $35 \pm 1$  vs  $34 \pm 1$  unités,  $p= 0,653$ ).

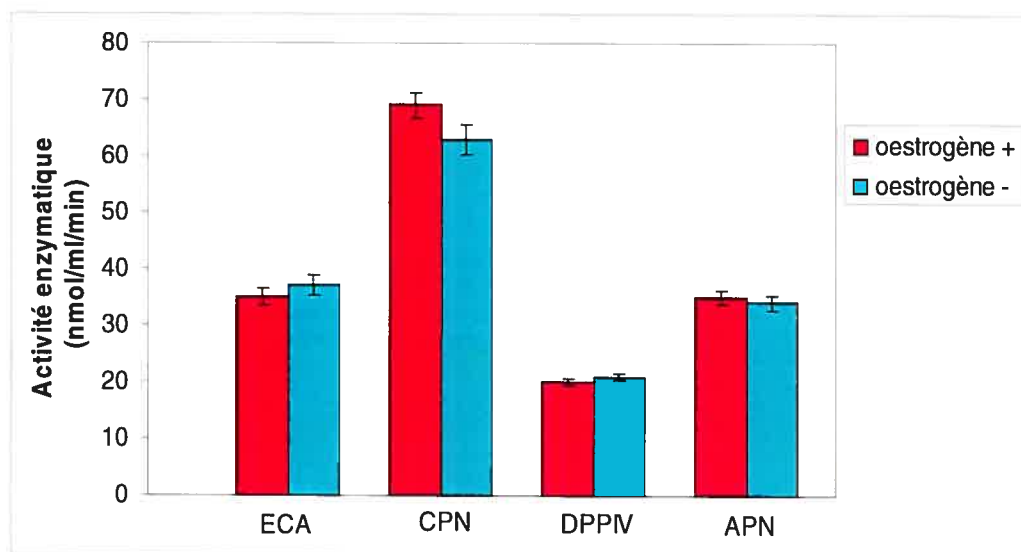
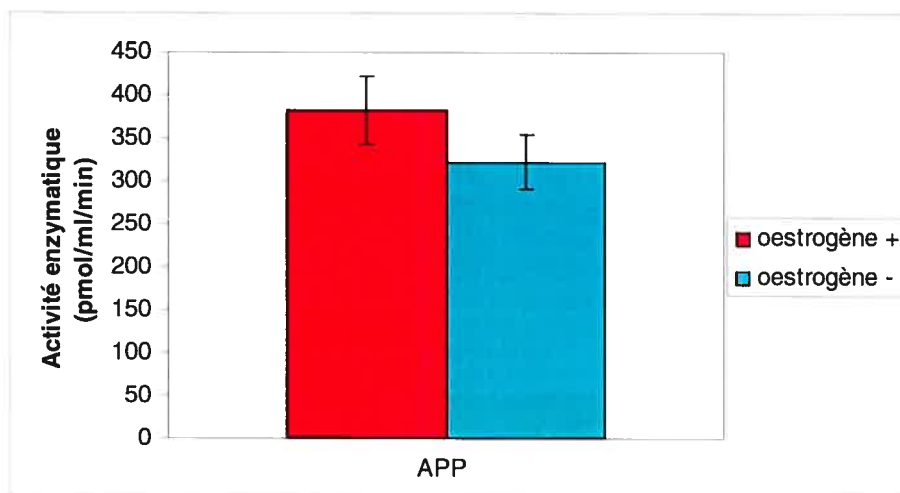


Figure 6. Moyenne de l'activité enzymatique des différentes peptidases plasmatiques (ECA, CPN, DPPIV et APN) chez le groupe de femmes sous prise de contraceptifs oraux comparativement au groupe ayant cessé le médicament.



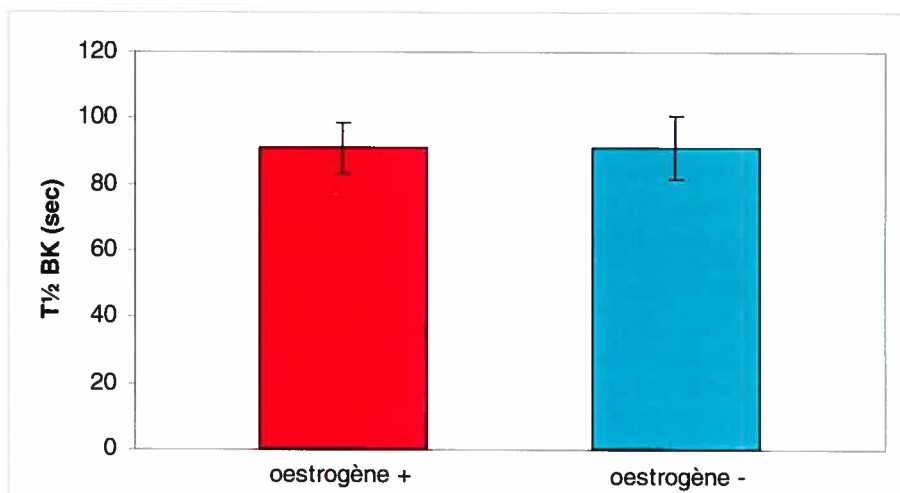
De même, la prise de contraceptifs oraux ne semble pas influencer les valeurs d'APP, puisque l'activité enzymatique mesurée lors de la période où le médicament était administré ( $382 \pm 40$  unités) n'était pas statistiquement différentes ( $p= 0,159$ ) de celle mesurée après arrêt du traitement ( $322 \pm 31$  unités) (figure 7).



**Figure 7. Moyenne de l'activité enzymatique de l'APP plasmatique des femmes ayant développé des crises d'AO lorsque recevant un contraceptif oral.**

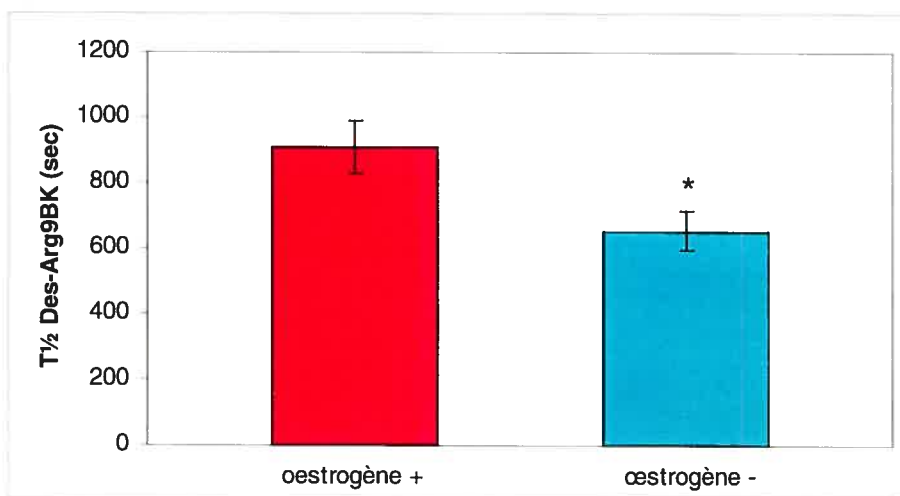
## **2. Demi-vies de dégradation de la BK et la des-Arg<sup>9</sup>-BK exogènes dans le plasma de patientes atteintes d'AO associé à la prise de contraceptifs oraux**

La figure 8 illustre la moyenne des  $t_{1/2}$  plasmatiques de la BK exogène incubée dans le plasma des patientes atteintes d'AO, prélevé pendant et après l'arrêt du médicament anovulatoire. Ces résultats montrent qu'il n'existe aucune différence significative de  $t_{1/2}$  de dégradation de la BK entre les deux conditions ( $91 \pm 8$  vs  $91 \pm 10$  secondes,  $p= 0,107$ ).



**Figure 8.** Moyenne des  $t_{1/2}$  de dégradation de la BK exogène ajoutée au plasma de patientes ayant présenté des épisodes d'AO suite à la prise de contraceptifs oraux.

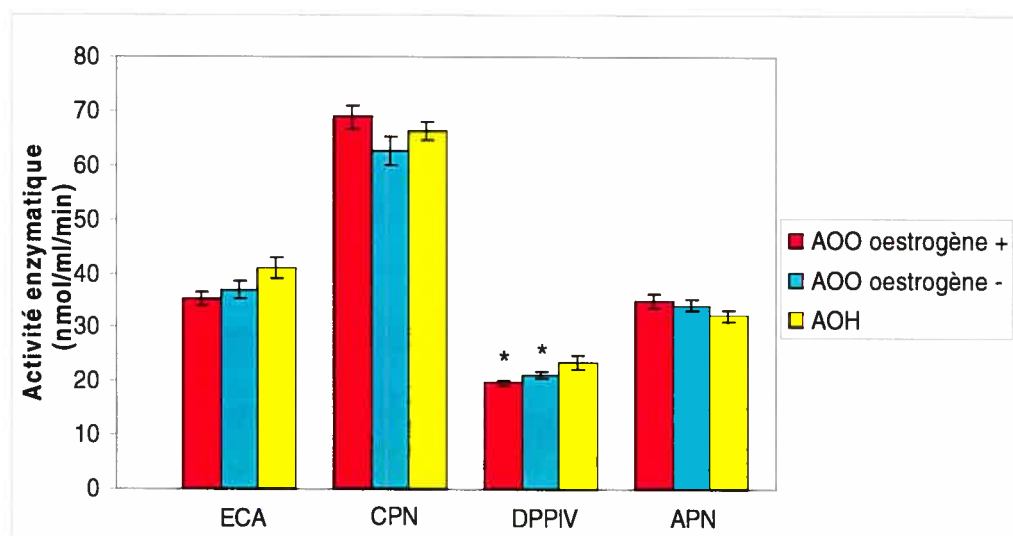
Par contre, la  $t_{1/2}$  de dégradation de la des-Arg<sup>9</sup>-BK dans le plasma du groupe œstrogène + ( $907 \pm 81$  secondes) était plus longue ( $p=0,041$ ) que dans le plasma du groupe œstrogène - ( $654 \pm 62$  secondes).



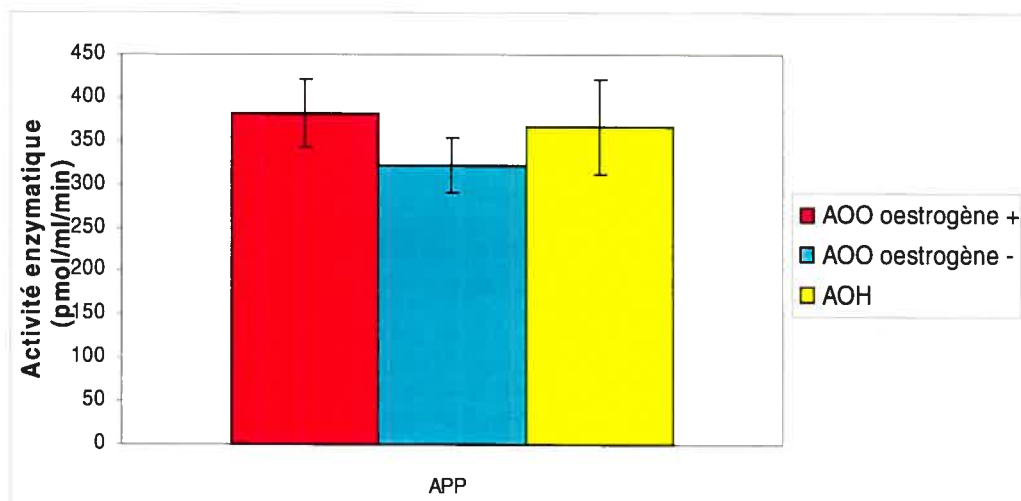
**Figure 9.** Moyenne des  $t_{1/2}$  de dégradation de la des-Arg<sup>9</sup>-BK exogène incubée dans le plasma de patientes atteintes d'un AO induit par un contraceptif oral (œstrogène + vs œstrogène -). (\*  $p=0,041$ )

**3. Comparaison des activités des peptidases plasmatiques et des  $t_{1/2}$  de dégradation des kinines exogènes entre les femmes ayant développé des crises d'AO lors de la prise d'un contraceptif oral et les femmes atteintes d'un angioedème héréditaire (AOH).**

Tel que représenté à la figure 10, une différence significative entre les deux types d'AO n'a été relevée que pour la DPPIV (œstrogène + vs AOH :  $20 \pm 1$  vs  $23 \pm 1$  unités,  $p= 0,020$  ; œstrogène - vs AOH :  $21 \pm 1$  vs  $23 \pm 1$  unités,  $p= 0,024$ ). Aucune différence significative n'a été observée pour l'activité des autres peptidases mesurées entre les patientes AOO et AOH (ECA :  $41 \pm 2$  unités,  $p= 0,06$  ; CPN :  $66 \pm 1$  unités,  $p= 0,135$  ; APN :  $32 \pm 1$  unités,  $p= 0,284$  ; APP :  $366 \pm 55$  unités,  $p= 0,570$ ) (figures 10 et 11).

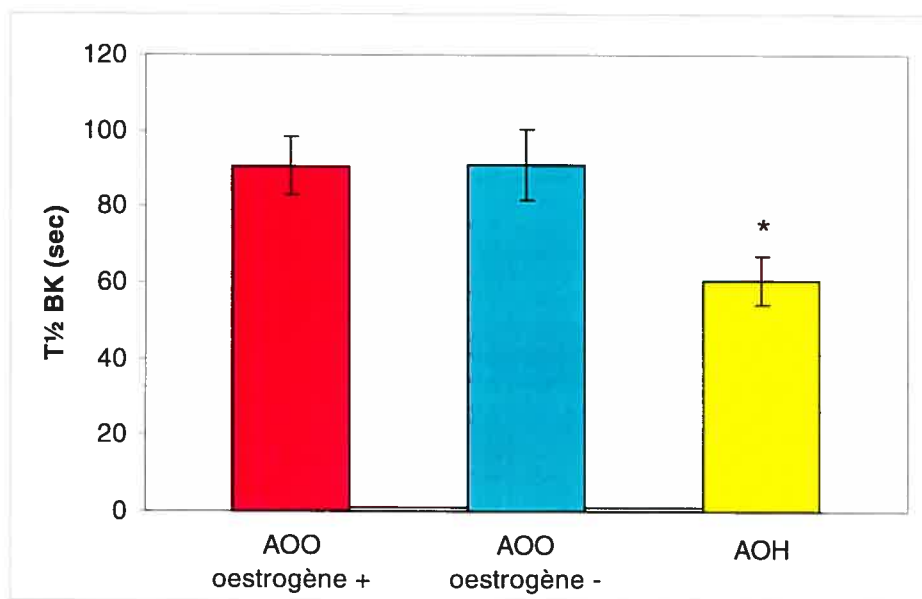


**Figure 10.** Moyenne de l'activité enzymatique des différentes peptidases plasmatiques (ECA, CPN, DPPIV et APN) chez les femmes souffrant d'AOO (œstrogène + et œstrogène -) et celles atteintes d'AOH. (\*  $p < 0,05$ )



**Figure 11.** Moyenne de l'activité enzymatique de l'APP plasmatique pour les groupes AOO (œstrogène + et œstrogène -) et AOH.

La valeur moyenne de  $t_{1/2}$  de BK exogène incubée dans le plasma de patientes AOH est significativement ( $p=0,026$ ) inférieure ( $60 \pm 6$  secondes) à celle mesurée dans le plasma des patientes AOO, quelque soit le moment du prélèvement.



**Figure 12.** Moyenne des  $t_{1/2}$  plasmatiques de la BK exogène ajoutée au plasma de patientes ayant présenté des épisodes d'AO suite à la prise de contraceptifs oraux et celles atteintes d'AOH. (\*  $p < 0,05$ )

Contrairement à la BK, la  $t_{1/2}$  de la des-Arg<sup>9</sup>-BK chez le groupe AOO œstrogène + n'était pas statistiquement différente de celle mesurée dans le plasma de patientes AOH (AOO œstrogène + vs AOH :  $907 \pm 81$  vs  $871 \pm 106$  secondes,  $p=0,066$ ) (figure 13). Toutefois, chez les patientes après sevrage du contraceptif, la  $t_{1/2}$  de la des-Arg<sup>9</sup>-BK plasmatique était significativement ( $p=0,036$ ) inférieure ( $654 \pm 62$  secondes) à celle mesurée chez les patientes AOH ( $871 \pm 106$  secondes) (figure 13).

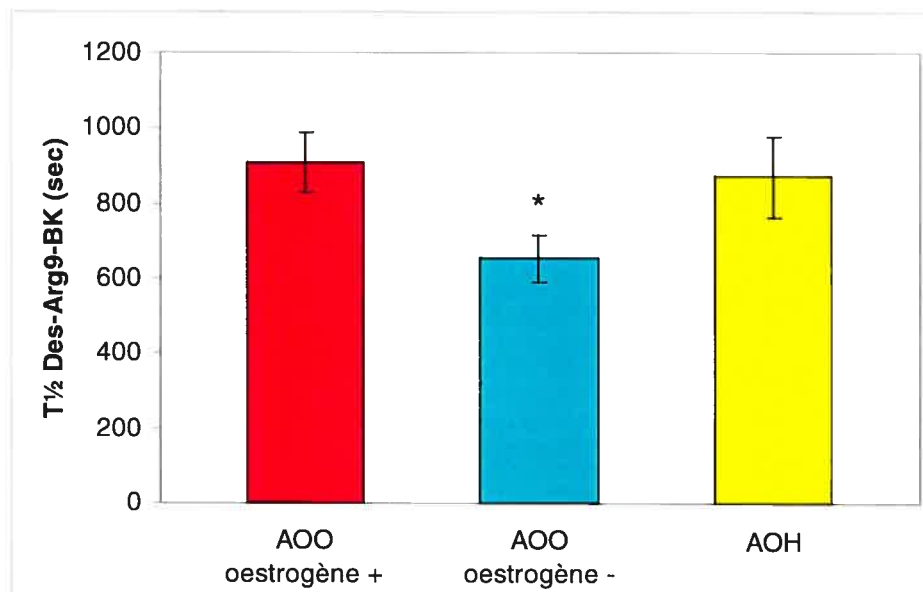


Figure 13. Moyenne des  $t_{1/2}$  plasmatiques de la des-Arg<sup>9</sup>-BK chez les patientes atteintes d'AOO et d'AOH. (\* $p < 0,05$ )

## II Mesure des kinines urinaires chez les patients ayant développé des crises d'angioedème de nature idiopathique

### 1. Dosage de la BK et la des-Arg<sup>9</sup>-BK immunoréactives dans l'urine de patients ayant développé des crises d'AO de nature idiopathique et dans l'urine d'un groupe témoin.

La concentration moyenne de BK immunoréactive dosée dans l'urine de trois patients angioedémateux ( $2,06 \pm 1,34$  nmol de BK/mmol de créatinine) n'est pas statistiquement différente de celle ( $2,11 \pm 0,13$  nmol de BK/mmol de créatinine,  $p=0,926$ ) mesurée dans le groupe témoin ( $n= 20$ ) (figure 14).

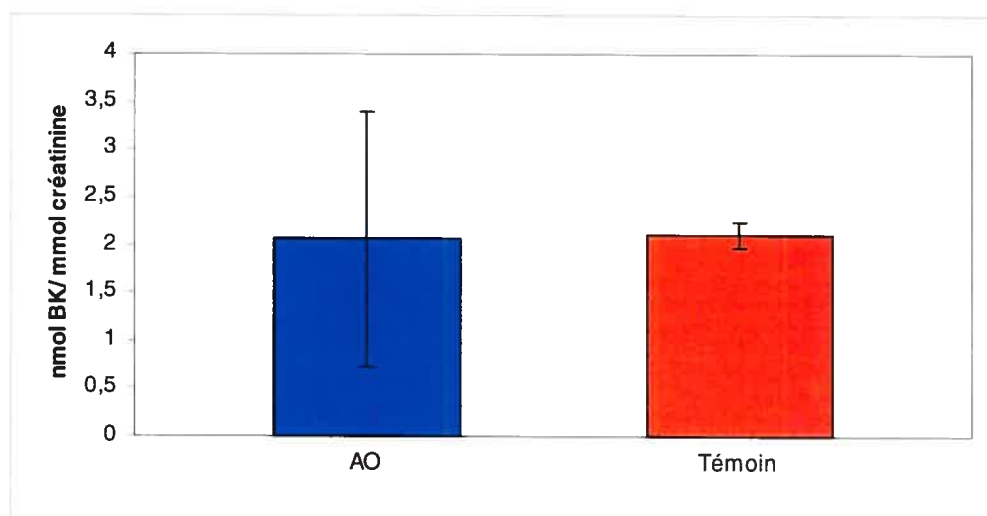
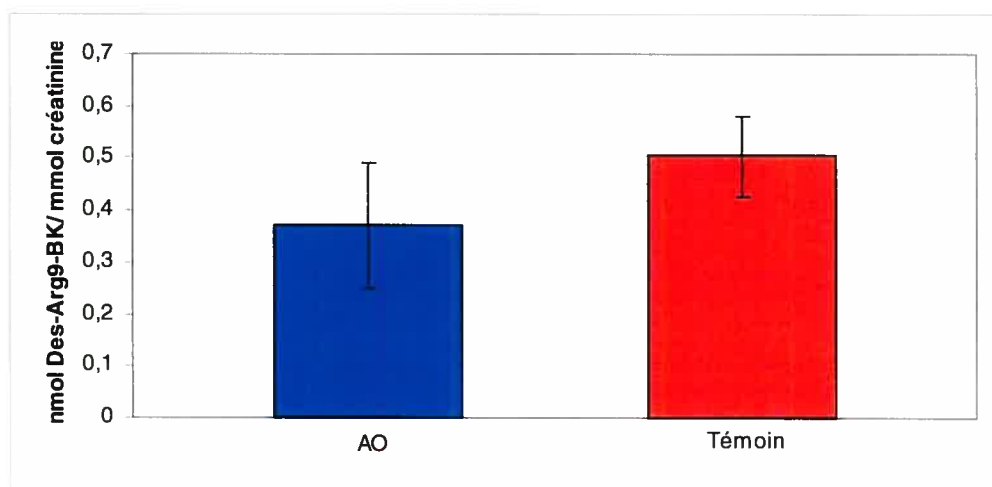


Figure 14. Concentration de BK dans l'urine de patients ayant développé des crises d'AO et dans l'urine du groupe témoin.

Les concentrations de des-Arg<sup>9</sup>-BK mesurées dans les mêmes échantillons ne sont pas non plus statistiquement différentes (AO :  $0,37 \pm 0,12$  nmol/mmol de créatinine ; témoin :  $0,50 \pm 0,08$  nmol/mmol de créatinine,  $p= 0,506$ ) (figure 15).

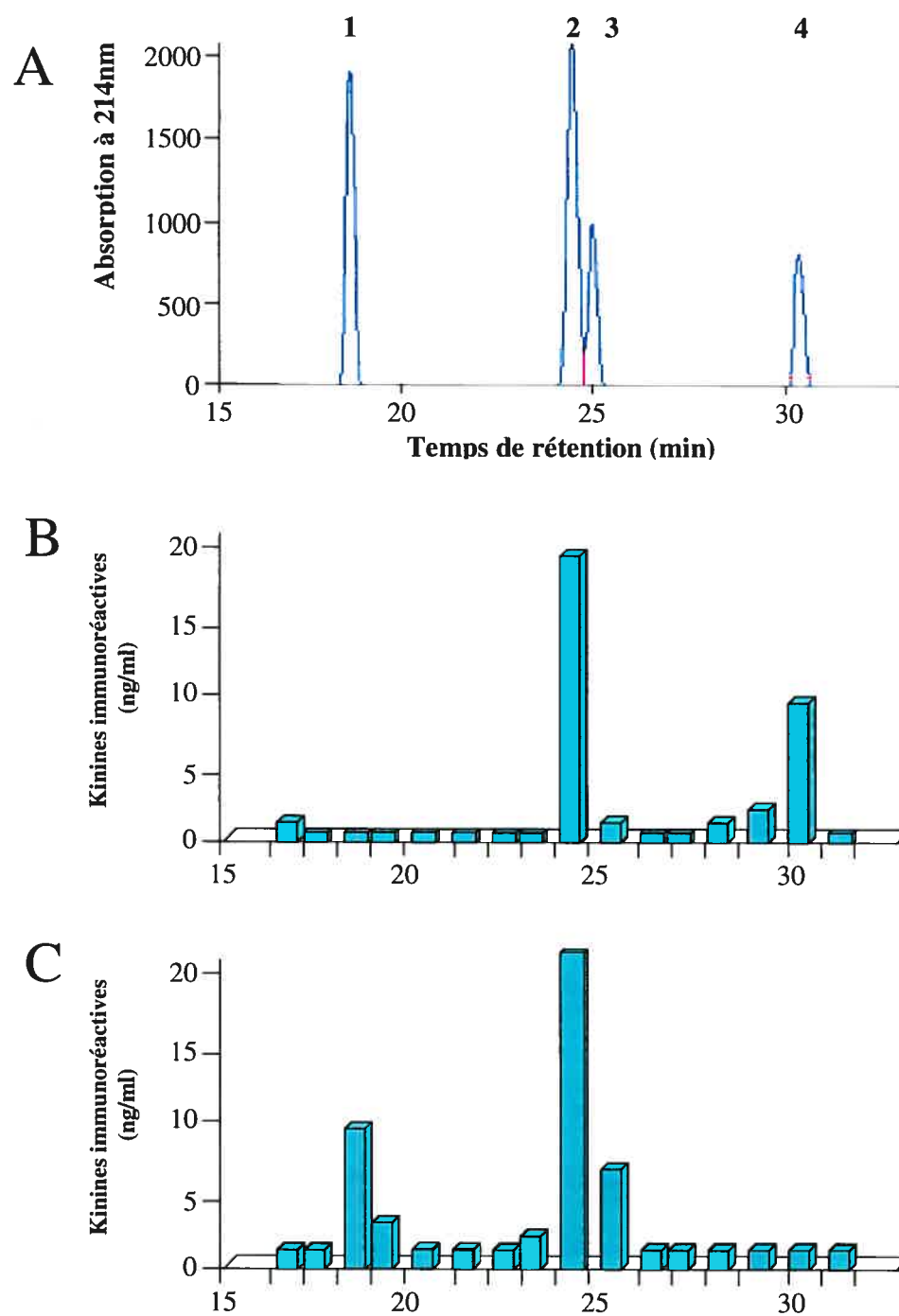


**Figure 15.** Concentration de la des-Arg<sup>9</sup>-BK dans l'urine de patients ayant développé des crises d'AO et dans l'urine du groupe témoin.

## **2. Caractérisation des kinines urinaires par chromatographie liquide à haute performance.**

L'immunogramme des kinines après passage sur un appareil de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est représenté à la figure 16. Une immunoréactivité de type BK a été détectée, non seulement pour la BK native (temps de rétention : 24,1 minutes), mais également au temps de rétention correspondant à la KD (29,8 minutes).

Une immunoréactivité des-Arg<sup>9</sup>-BK a également été détectée à 18,6 et 24,7 minutes, qui sont les temps de rétention de des-Arg<sup>9</sup>-BK et de des-Arg<sup>10</sup>-KD respectivement.



**Figure 16.** Caractérisation des kinines immunoréactives par HPLC. A) Profil d'éluion (absorption 240 nm) des peptide de référence : 1) Des-Arg<sup>9</sup>-BK, 2) BK, 3) Des-Arg<sup>10</sup>-KD, 4) KD. B) Détection d'une immunoréactivité aux temps de rétention de BK et de KD. C) Détection d'une immunoréactivité au temp de rétention de Des-Arg<sup>9</sup>-BK et de Des-Arg<sup>10</sup>-KD.



### III Étude de l'expression génique de certains constituants du système kallicroïnes-kinines au niveau du tissu oropharyngé chez le porc

#### 1. Spécificité des amorces

Les analyses de courbes de fusion représentent une méthode rapide et efficace pour vérifier la spécificité des produits de PCR. Elles sont illustrées à la figure 17 sous forme de première dérivée négative de la fluorescence vs la température de fusion pour chaque gène d'intérêt (APN, DPPIV et KG) ainsi que pour le gène de référence (GAPDH). Un contrôle négatif (-) est également représenté dans la figure. On observe un seul pic propre à chaque amplicon correspondant bien au produit de taille attendu vérifié par une migration sur gel d'agarose, tel qu'illustré à la figure 18.

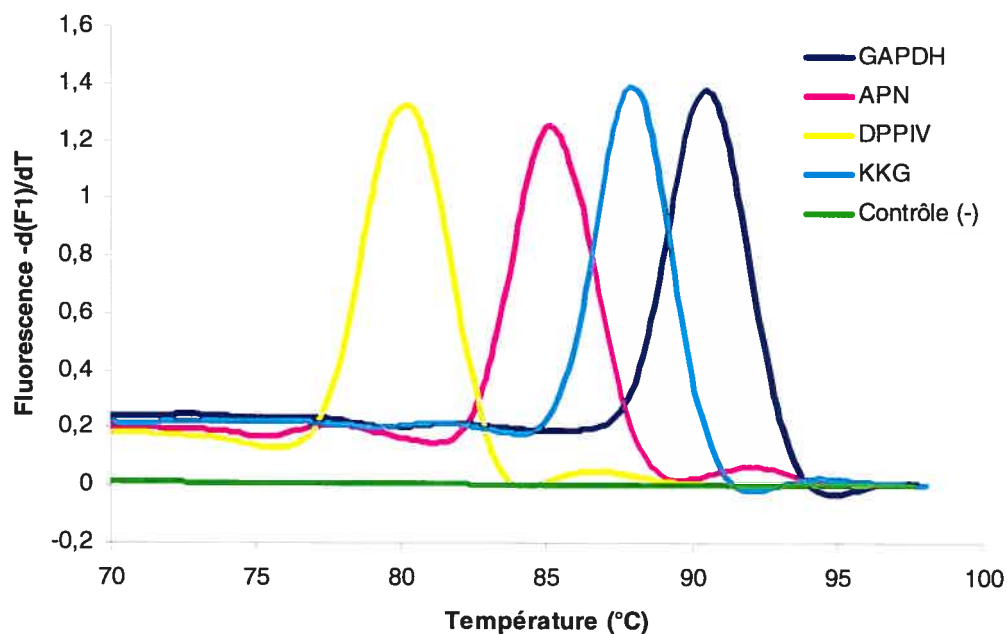
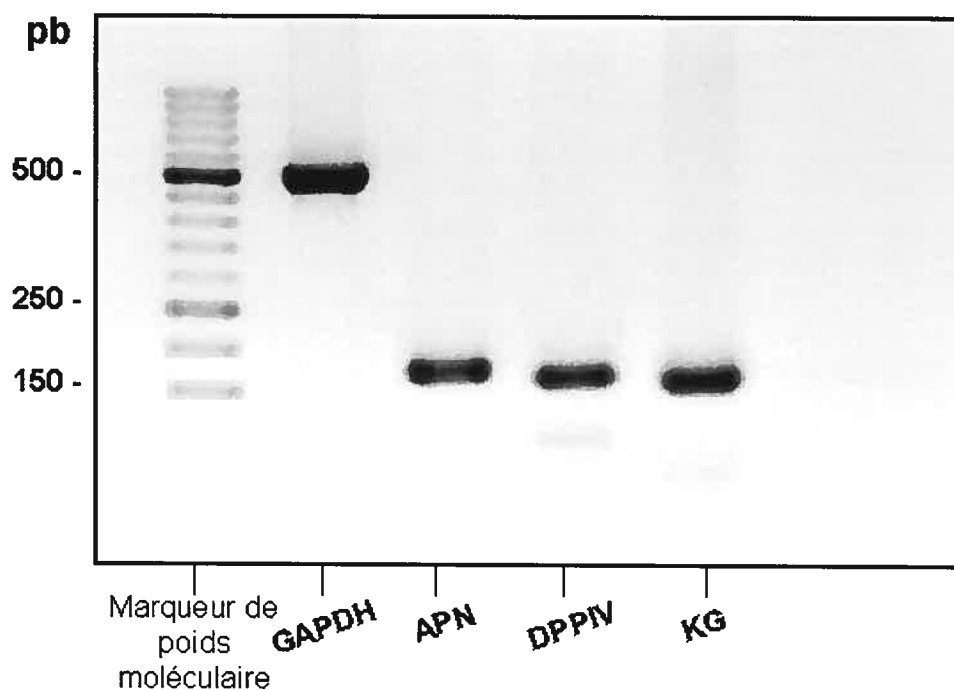


Figure 17. Courbes de fusion pour chacun des gènes d'intérêt étudiés.

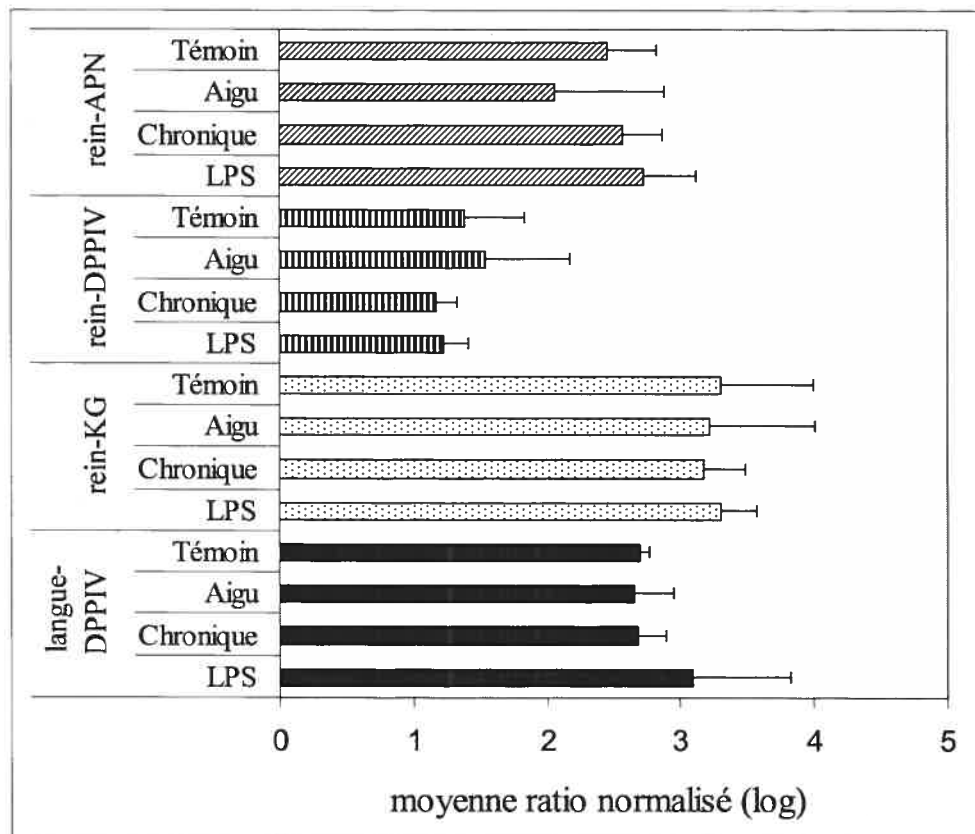
En effet, la spécificité des produits de PCR a aussi été confirmée par électrophorèse en gel d'agarose. Le poids moléculaire attendu pour l'amplicon GAPDH est de 500 pb, tandis que pour l'APN, la DPPIV et la KG, leur produit de PCR a un poids moléculaire de 172, 162 et 150 pb, respectivement.



**Figure 18.** Visualisation de chaque amplicon sur un gel d'agarose 2%.

## 2. Quantification relative de l'expression des différents gènes dans les tissus : comparaison entre les quatre groupes de porcs

La figure 19 représente le logarithme des moyennes des ratios normalisés vs le GAPDH pour les différents gènes étudiés (ratio des concentrations ARNm gène d'intérêt/ARNm GAPDH). Aucune différence significative ne fut obtenue pour l'expression de l'APN au niveau du rein entre les 4 groupes ( $p= 0,254$ ), ni pour la DPPIV ( $p= 0,510$ ), et pour la KG ( $p= 0,966$ ). Au niveau de la langue, on n'observe pas non plus de différence significative dans l'expression de la DPPIV entre les groupes ( $p= 0,349$ ). Ainsi, l'expression de ces différents composants retrouvés dans le rein et la langue n'a pas été modulée par un traitement aux iECAs. En ce qui a trait à l'APN et la KG au niveau de la langue, leur expression n'a pas été détectée.



**Figure 19.** Logarithme des moyennes des ratios normalisés ARNm APN, DPPIV, KG/ARNm GAPDH au niveau du rein et de la langue.

## DISCUSSION GÉNÉRALE

Il y a 130 ans, Milton décrit pour la première fois les symptômes de l'AO. Depuis, de nombreuses études ont tenté de comprendre la physiopathologie de cette affection rare mais potentiellement mortelle. Ces travaux ont conduit à l'établissement d'une classification en la forme héréditaire (AOH) et acquise (AOA).

Jusqu'à maintenant, l'AOH constitue la forme la plus étudiée et des études ont tenté de démontrer qu'un contrôle déficient du système kallibréines-kinines par l'inhibiteur C1 est responsable de la production incontrôlée de BK (Davis, 2003). L'AO associée à la prise d'iECA, une forme acquise d'AO, serait dû par contre à un déficit du métabolisme des kinines puisque les travaux menés dans notre laboratoire ont montré un déficit d'APP, responsable de l'accumulation de la des-Arg<sup>9</sup>-BK in vitro, le métabolite actif de la BK, pendant l'activation du système de contact. D'autres études plaident aussi pour un déterminisme de nature génétique pour expliquer la nature de l'anomalie de l'APP chez cette forme d'AO (Adam et al, 2002 ; Molinaro et al, 2002b ; Duan et al, 2005). Quant à l'AO associée à la prise d'oestrogènes (AOO), il a été jusqu'à ce jour peu étudié et mal compris même si certaines études ont montré une augmentation de l'expression du facteur XII (Gordon et al, 1980 et 1988; Jespersen et Kluff, 1985; Farsetti et al, 1995) et de la prékallibréine (Fossum et al, 1994) par les œstrogènes. Enfin, les médiateurs de ces réactions inflammatoires locales que constituent les différents types d'AO n'ont pas été définitivement élucidés.

Dans ce mémoire de maîtrise, nous avons exploré trois groupes de facteurs susceptibles d'apporter un éclaircissement supplémentaire à la physiopathologie de l'AO. En premier lieu, nous avons documenté le métabolisme des kinines dans le plasma de patientes ayant connu des épisodes d'AO associés à la prise de contraceptifs oraux. Nous n'avons pas pu mettre en évidence une influence du contraceptif oral sur l'activité des principales enzymes impliquées dans le métabolisme de la BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-BK, soit l'ECA, l'APP, la CPN, la DPPIV et l'APN. Toutefois, la t<sub>1/2</sub> de dégradation de la des-Arg<sup>9</sup>-BK était significativement plus courte chez les patientes ayant cessé le médicament anovulatoire. Puisque aucune différence n'a pu être mesurée pour les différentes peptidases, cette observation suggère un contrôle par les

œstrogènes d'une activité peptidasique non explorée et non impliquée dans le métabolisme de la BK. Ces résultats ouvrent des perspectives de recherche sur la relation entre la nature du contraceptif oral et l'effet sur le métabolisme des kinines et en particulier celui de la des-Arg<sup>9</sup>-BK. Nous n'avons pu aborder cet aspect puisque les patientes explorées recevaient quinze types différents de contraceptif au moment de l'épisode d'AO. Cette approche serait notamment intéressante pour documenter l'effet des contraceptifs particulièrement riche en cyprotérone, composé anti-androgène, comme la Diane 35. Lorsque nous avons comparé ces cas d'AOO à un groupe de patientes souffrant d'AOH, nous avons montré que l'activité de la DPPIV était légèrement plus faible chez les femmes ayant eu des épisodes d'AO associés à la prise d'œstrogènes. De plus, une t<sub>1/2</sub> de dégradation de la BK significativement plus courte dans le groupe AOH a également été mesurée. Si on compare les groupes AOH et AOO après sevrage du contraceptif, la t<sub>1/2</sub> de dégradation de la des-Arg<sup>9</sup>-BK était significativement plus courte chez le second. Puisque la prise du médicament à base d'œstrogène était interrompue, la t<sub>1/2</sub> de dégradation de la des-Arg<sup>9</sup>-BK est devenue plus courte, les patientes n'étant plus sujettes à développer une crise d'AO, tandis que chez le groupe sous contraceptif oral, la t<sub>1/2</sub> mesurée était similaire à celle du groupe AOH. Ceci apporte une démonstration additionnelle que les œstrogènes ont un effet sur le métabolisme de la des-Arg<sup>9</sup>-BK chez les femmes ayant développé des crises d'AO sous contraceptif oral. Le déclenchement d'épisodes d'AO semble être intimement relié au métabolisme des kinines, particulièrement de la des-Arg<sup>9</sup>-BK, étant donné que la t<sub>1/2</sub> mesurée était semblable entre les groupes AOO avec prise du médicament anovulant et le groupe AOH, et redevenait plus courte après sevrage.

Dans leur ensemble ces observations n'apportent pas d'éléments nouveaux dans la compréhension de la physiopathologie de l'AOO puisque le rôle exact des œstrogènes dans le développement de cette réaction inflammatoire est encore inconnu.

Les épisodes d'AO s'accompagnent d'une diurèse accrue, une fois passée la phase aiguë. C'est la raison pour laquelle nous avons voulu explorer les kinines urinaires chez un nombre limité de patientes. L'effet diurétique des kinines est en effet bien connu. Nous avons donc documenté l'excrétion des kinines urinaires dans la période qui suit la phase aiguë de l'AO. Ni la concentration de BK ni celle de la des-Arg<sup>9</sup>-BK ne présentaient de différences avec les concentrations des kinines urinaires mesurées chez un groupe témoin. Comme la méthode immunologique de dosage

utilise des anticorps dirigés contre la partie COOH terminale des peptides, nous avons documenté la partie NH<sub>2</sub> terminale des peptides immunoréactifs séparés par méthode HPLC afin de différencier la BK de la KD ainsi que la des-Arg<sup>9</sup>-BK de la des-Arg<sup>10</sup>-KD. Dans ce cas, nous n'avons pas mis en évidence des différences qualitatives dans les kinines éluées, bien que ce fût quelque peu prévisible. En effet, l'AO est caractérisé par une inflammation locale produisant une libération de kinines. Comme celles-ci possèdent un temps de t<sup>1/2</sup> assez court, elles sont donc dégradées totalement dans le plasma avant de se retrouver au niveau du rein. Ces résultats apparemment négatifs présentent cependant un intérêt ; en effet, les kinines urinaires originent du tubule proximal, ainsi une absence de différences tant qualitative que quantitative plaide contre une anomalie de la fonction urinaire pendant la crise d'AO.

En dernier lieu, nous avons étudié certains constituants du système kallibréines-kinines au niveau de tissus, langue et rein, prélevés à partir d'un animal, soit le porc, ayant reçu un iECA. Les constituants étudiés (l'APN, la DPPIV et la KG) sont susceptibles de jouer un rôle dans la physiopathologie de la réaction inflammatoire locale accompagnant l'AO. Ces travaux complètent d'autres réalisés précédemment où nous avons montré une induction des récepteurs B1 par un traitement chronique au moyen d'un iECA (Moreau et al, 2005b). Les résultats obtenus lors de notre étude démontrent une expression de ces différentes kininases ainsi que de la KG dans le rein et la langue du porc. Par contre, ni une administration d'iECA, chronique ou aigu, ni de LPS n'ont modifié l'expression de ces enzymes dans les tissus étudiés. L'absence d'une modulation de l'expression de ces gènes dans nos conditions expérimentales plaide donc contre un rôle important de ces enzymes dans la physiopathologie de l'AO lié aux iECAs, du moins chez le porc.

En conclusion, notre travail de maîtrise a poussé plus loin la compréhension du rôle des kinines dans la physiopathologie de différents types d'angiooedème. Nos résultats ouvrent de nouvelles voies de recherche dans ce domaine en continu développement. L'absence de données probantes quant au métabolisme des kinines plasmatiques et leur excrétion urinaire nous porte à penser que les kinines ne sont pas les médiateurs définitifs de l'AO. Nous devons nous souvenir que l'angiooedème fut d'abord décrit comme œdème angioneurotique où les neurokinines pourraient être les vrais médiateurs pharmacologiques, les kinines ne jouant qu'un rôle d'intermédiaires.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abdelhaleem M, Sabbadini E. (1992) *Identification of immunosuppressive fractions from the rat submandibular salivary gland*. Immunology. 76 : p.331-337.
- Abelous JE, Bardier E. (1909) *Les substances hypotensives de l'urine humaine normale*. Comptes-Rendus de la Société de Biologie (Paris). 66 : p.511-512.
- Abbott CA, Baker E, Sutherland GR, McCaughan GW. (1994) *Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene*. Immunogenetics. 40 : p.331-338.
- Adam A, Cugno M, Molinaro G, Perez M, Lepage Y, Agostoni A. (2002) *Aminopeptidase P in individuals with a history of angio-oedema on ACE inhibitors*. The Lancet. 359 : p.2088-2089.
- Agostoni A, Cicardi M. (1992) *Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients*. Medicine (Baltimore). 71 : p.206-215.
- Agostoni A, Aygoren-Pursun E, Binkley KE, Blanch A, Bork K, Bouillet L, Bucher C, Castaldo AJ, Cicardi M, Davis AE, De Carolis C, Drouet C, Duponchel C, Farkas H, Fay K, Fekete B, Fischer B, Fontana L, Fust G, Giacomelli R, Groner A, Hack CE, Harmat G, Jakenfelds J, Juers M, Kalmar L, Kaposi PN, Karadi I, Kitzinger A, Kollar T, Kreuz W, Lakatos P, Longhurst HJ, Lopez-Trascasa M, Martinez-Saguer I, Monnier N, Nagy I, Nemeth E, Nielsen EW, Nuijens JH, O'grady C, Pappalardo E, Penna V, Perricone C, Perricone R, Rauch U, Roche O, Rusicke E, Spath PJ, Szendei G, Takacs E, Tordai A, Truedsson L, Varga L, Visy B, Williams K, Zanichelli A, Zingale L. (2004) *Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond*. Journal of Allergy Clinical Immunology. 114 : p.51-131.

Arakawa K, Maruta H. (1980) *Ability of kallikrein to generate angiotensin II-like pressor substance and a proposed 'kinin-tensin enzyme system'*. Nature. 288 : p.705-706.

Azizi M, Boutouyrie P, Bissery A, Agharazii M, Verbeke F, Stern N, Bura-Riviere A, Laurent S, Alhenc-Gelas F, Jeunemaitre X. (2005) *Arterial and renal consequences of partial genetic deficiency in tissue kallikrein activity in humans*. Journal of Clinical Investigation. 115 : p.780-787.

Barker PE, Shipp MA, D'Adamio L, Masteller EL, Reinherz EL. (1989) *The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3 (q21-q27)*. Journal of Immunology. 142 : p.283-287.

Barret AJ. (1996) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). *Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 3: corrections and additions (1995)*. European Journal of Biochemistry. 237 : p.1-5.

Beaubien G, Rosinski-Chupin I, Mattei MG, Mbikay M, Chretien M, Seidah NG. (1991) *Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein*. Biochemistry. 30 : p.1628-1635.

Berry TD, Hasstedt SJ, Hunt SC, Wu LL, Smith JB, Ash KO, Kuida H, Williams RR. (1989) *A gene for high urinary kallikrein may protect against hypertension in Utah kindreds*. Hypertension. 13 : p.3-8.

Bhoola KD, May May Yi R, Morley J, Schachter, M. (1962) *Release of kinin by an enzyme in the accessory sex glands of the guinea-pig*. The Journal of Physiology (London). 163 : p.269-280

Bhoola KD. (1971) *Comment on the conversion of pro-insulin to insulin*. In: Heller G, Lederis K (eds) *Subcellular Organisation and Function in Endocrine Tissues*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p.493-494.



Bhoola KD, Lemon MJ, Matthews RW. (1979) *Kallikrein in exocrine glands*. In Handbook of Experimental Pharmacology. Supplement Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. Erdös EG (ed), New-York. 25: p.489-523.

Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. (1992) *Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases*. Pharmacological Reviews. 44 : p.1-80.

Binkley KE, Davis AE 3rd. (2000) *Clinical, biochemical, and genetic characterization of a novel estrogen-dependent inherited form of angioedema*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 106 : p.546-550.

Blais C Jr, Couture R, Drapeau G, Colman RW, Adam A. (1997a) *Involvement of endogenous kinins in the pathogenesis of peptidoglycan-induced arthritis in the Lewis rat*. Arthritis Rheumatism. 40 : p.1327-1333.

Blais C Jr, Drapeau G, Raymond P, Lamontagne D, Gervais N, Venneman I, Adam A. (1997b) *Contribution of angiotensin-converting enzyme to the cardiac metabolism of bradykinin: an interspecies study*. American Journal of Physiology. 273 : p.H2263-H2271.

Blais C Jr, Marc-Aurele J, Simmons WH, Loute G, Thibault P, Skidgel RA, Adam A. (1999a) *Des-Arg9-bradykinin metabolism in patients who presented hypersensitivity reactions during hemodialysis: role of serum ACE and aminopeptidase P*. Peptides. 20 : p.421-430.

Blais C Jr, Rouleau JL, Brown NJ, Lepage Y, Spence D, Munoz C, Friborg J, Geadah D, Gervais N, Adam A. (1999b) *Serum metabolism of bradykinin and des-Arg9-bradykinin in patients with angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema*. Immunopharmacology. 43 : p.293-302.

Blais C Jr, Marceau F, Rouleau JL, Adam A. (2000) *The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins*. Peptides. 21 : p.1903-1940.

Blau N, Niederweiser A, Shmerling DH. (1988) *Peptiduria presumably caused by aminopeptidase-P deficiency. A new inborn error of metabolism.* Journal of Inherited Metabolic Disease. 11 : p.240-242.

Boissonnas RA, Guttmann S, Jaquenoud PA, Konzett H, Stuermer E. (1960) *Synthesis and biological activity of peptides related to bradykinin.* Experientia. 16 : p.326.

Bork K, Barnstedt SE, Koch P, Traupe H. (2000) *Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women.* Lancet. 356 : p.213-217.

Bothwell MA, Wilson WH, Shooter EM. (1979) *The relationship between glandular kallikrein and growth factor-processing proteases of mouse submaxillary gland.* The Journal of Biological Chemistry. 254 : p.7287-7294.

Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir JF, Munoz JM. (1940) *The substance causing renal hypertension.* The Journal of Physiology (London). 98 : p.283-298.

Brown NJ, Nadeau JH, Vaughan DE. (1997) *Selective stimulation of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in vivo by infusion of bradykinin.* Thrombosis and Haemostasis. 77 : 522-525.

Brown NJ, Blais C Jr, Gandhi SK, Adam A. (1998) *ACE insertion/deletion genotype affects bradykinin metabolism.* Journal of Cardiovascular Pharmacology. 32 : p.373-377.

Busse R, Fleming I. (1996) *Molecular responses of endothelial tissue to kinins.* Diabetes. 45: p.S8-S13.

Caldwell JR, Ruddy S, Schur PH, Austen KF. (1972) *Acquired C1 inhibitor deficiency in lymphosarcoma.* Clinical Immunology and Immunopathology. 1 : p.39-52.

Cardin AD, Witt KR, Chao J, Margolius HS, Donaldson VH, Jackson RL. (1984) *Degradation of apolipoprotein B-100 of human plasma low density lipoproteins by tissue and plasma kallikreins*. Journal of Biological Chemistry. 259 : 8522-8528.

Chao J, Chao L. (1988) *Identification of latent tissue kallikrein, prolactin and growth hormone secretion in GH3 pituitary cells using modified radioimmunoassays*. Molecular and Cellular Endocrinology. 55 : p.21-31.

Chao J, Chao L. (2005) *Kallikrein-kinin in stroke, cardiovascular and renal disease*. Experimental Physiology. 90 : p.291-298.

Chapman ID, Leach JT, Bhoola KD. (1986) *Studies on renal and urinary kallikrein in spontaneously hypertensive rats*. Advances in experimental medicine and biology. 198 : p.219-224.

Cheung PP, Cannizzaro LA, Colman RW. (1992) *Chromosomal mapping of human kininogen gene (KNG) to 3q26----qter*. Cytogenetics and Cell Genetetics. 59 : p.24-26.

Chung DW, Fujikawa K, McMullen BA, Davie EW. (1986) *Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats*. Biochemistry. 25 : p.2410-2417.

Cicardi M, Bergamaschini L, Zingale LC, Gioffre D, Agostoni A. (1999) *Idiopathic nonhistaminergic angioedema*. American Journal of Medicine. 106 : p.650-654.

Classen-Linke I, Denker HW, Winterhager E. (1987) *Apical plasma membrane-bound enzymes of rabbit uterine epithelium. Pattern changes during the periimplantation phase*. Histochemistry. 87 : p.517-529.

Clements JA, Fuller PJ, McNally M, Nikolaidis I, Funder JW. (1986) *Estrogen regulation of kallikrein gene expression in the rat anterior pituitary*. Endocrinology. 119 : p.268-273.

Clements JA, Matheson BA, Wines DR, Brady JM, MacDonald RJ, Funder JW. (1988) *Androgen dependence of specific kallikrein gene family members expressed in rat prostate*. The Journal of Biological Chemistry. 263 : p.16132-16137.

Clements JA, Matheson BA, MacDonald RJ, Funder JW. (1989) *The expression of the kallikrein gene family in the rat pituitary oestrogen effects and the expression of an additional family member in the neurointermediate lobe*. Journal of Neuroendocrinology. 1 : p.199-203.

Clements JA, Matheson BA, Funder JW. (1990) *Tissue-specific developmental expression of the kallikrein gene family in the rat*. The Journal of Biological Chemistry. 265 : p.1077-1081.

Clements JA, Mukhtar A, Ehrlich A, Yap B. (1994) *Kallikrein gene expression in the human uterus*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 27 : p.1855-1863.

Colman RW. (1969) *Activation of plasminogen by human plasma kallikrein*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 35 : p.273-279.

Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. (2001) *Kinin receptors in pain and inflammation*. European Journal of Pharmacology. 429 : p.161-176.

Cugno M, Hack CE, de Boer JP, Eerenberg AJ, Agostoni A, Cicardi M. (1993) *Generation of plasmin during acute attacks of hereditary angioedema*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 121 : p.38-43.

Cugno M, Nussberger J, Cicardi M, Agostoni A. (2003) *Bradykinin and the pathophysiology of angioedema*. International Immunopharmacology. 3 : p.311-317.

Curd JG, Prograis LJ Jr, Cochrane CG. (1980) *Detection of active kallikrein in induced blister fluids of hereditary angioedema patients*. Journal of Experimental of Medicine. 152 : p.742-747.

Currie MG, Geller DM, Chao J, Margolius HS, Needleman P. (1984) *Kallikrein activation of a high molecular weight atrial peptide*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 120 : p.461-466.

Cyr M, Hume HA, Champagne M, Sweeney JD, Blais C Jr, Gervais N, Adam A. (1999) *Anomaly of the des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin metabolism associated with severe hypotensive reactions during blood transfusions: a preliminary study*. Transfusion. 39 : p.1084-1088.

Cyr M, Eastlund T, Blais C Jr, Rouleau JL, Adam A. (2001) *Bradykinin metabolism and hypotensive transfusion reactions*. Transfusion. 41 : p.136-150.

Danser AH, Schunkert H. (2000) *Renin-angiotensin system gene polymorphisms: potential mechanisms for their association with cardiovascular diseases*. European Journal of Pharmacology. 410 : p.303-316.

Davis AE III. (2003) *The pathogenesis of hereditary angioedema*. Transfusion and Apheresis Science. 29 : p.195-203.

Décarie A, Drapeau G, Closset J, Couture R, Adam A. (1994) *Development of digoxigenin-labeled peptide : application to chemiluminoenzyme immunoassay of bradykinin in inflamed tissues*. Peptides. 15 : p.511-518.

Decarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R, Adam A. (1996) *Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg<sup>9</sup>]BK: influence of enalaprilat*. American Journal of Physiology. 271 : H1340-H1347.

Deddish PA, Skidgel RA, Kriho VB, Li XY, Becker RP, Erdös EG. (1990) *Carboxypeptidase M in Madin-Darby canine kidney cells. Evidence that carboxypeptidase M has a phosphatidylinositol glycan anchor*. The Journal of Biological Chemistry. 265 : p.15083-15089.

Delmas B, Gelfi J, L'Haridon R, Vogel LK, Sjostrom H, Noren O, Laude H. (1992) *Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV*. Nature. 357 : p.417-420.

Derx FH, Tan-Tjiong HL, Man in't Veld AJ, Schalekamp MP, Schalekamp MA. (1979) *Activation of inactive plasma renin by tissue kallikreins*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 49 : p.765-769.

Derx FH, Schalekamp MP, Schalekamp MA. (1987) *Two-step prorenin-renin conversion. Isolation of an intermediary form of activated prorenin*. Journal of Biological Chemistry. 262: p.2472-2477.

Diamandis EP, Yousef GM, Luo LY, Magklara A, Obiezu CV. (2000) *The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis*. Trends in Endocrinology and Metabolism. 11 : p.54-60.

Donaldson VH, Evans RR. (1963) *A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema: absence of serum inhibitor of C' 1-esterase*. The American Journal of Medicine. 35 : p.37-44.

Drapeau G, deBlois D, Marceau F. (1991) *Hypotensive effects of Lys-des-Arg9-bradykinin and metabolically protected agonists of B1 receptors for kinins*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 259 : p.997-1003.

Duan QL, Nikpoor B, Dube MP, Molinaro G, Meijer IA, Dion P, Rochefort D, Saint-Onge J, Flury L, Brown NJ, Gainer JV, Rouleau JL, Agostoni A, Cugno M, Simon P, Clavel P, Potier J, Wehbe B, Benarbia S, Marc-Aurele J, Chanard J, Foroud T, Adam A, Rouleau GA. (2005) *A variant in XPNPEP2 is associated with angioedema induced by angiotensin I-converting enzyme inhibitors*. American Journal of Human Genetics. 2005 Oct;77(4):617-26.

Dumoulin MJ, Adam A, Blais C Jr, Lamontagne D. (1998) *Metabolism of bradykinin by the rat coronary vascular bed*. Cardiovasc Research. 38 : p.229-236.

Eeckhout Y, Vaes G. (1977) *Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation.* Biochemical Journal. 166 : p.21-31.

Elliott DF, Horton EW, Lewis GP. (1960) *Actions of pure bradykinin.* Journal of Physiology. 153 : p.473-480.

Erdös EG, Renfrew AG, Sloane EM, Wholer JR. (1963) *Enzymatic studies on bradykinin and similar peptides.* Annals of the New York Academic of Sciences. 10 : p.222-234.

Erdös EG, Tague LL, Miwa I. (1968) *Kallikrein in granules of the submaxillary gland.* Biochemical Pharmacology. 17 : p.667-674.

Erdös EG, Yang HYT. (1970) *Kininases.* In: Erdös EG, editor. Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. Handbook of Experimental Pharmacology. Volume XXV. Heidelberg: Springer. p. 289-323.

Erdös EG. (1989) *From measuring the blood pressure to mapping the gene: the development of the ideas of Frey and Werle.* In: Fritz H, Schmidt I, Dietze G, eds. *The Kallikrein-Kinin System in Health and Disease.* Munich, Germany: Limbach-Verlag Braunschweig. p.261-276.

Erdös EG. (1990) *Some old and some new ideas on kinin metabolism.* Journal of Cardiovascular Pharmacology. 15 : p.S20-S24.

Erdös EG, Skidgel RA. (1997) *Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease.* In: Farmer SG, editor. Handbook of immunopharmacology: the kinin system. London: Academic Press. P.111-141.

Evans BA, Yun ZX, Close JA, Tregear GW, Kitamura N, Nakanishi S, Callen DF, Baker E, Hyland VJ, Sutherland GR, et al. (1988) *Structure and chromosomal localization of the human renal kallikrein gene.* Biochemistry. 27 : p.3124-3129.

- Farsetti A, Misiti S, Citarella F, Felici A, Andreoli M, Fantoni A, Sacchi A, Pontecorvi A. (1995) *Molecular basis of estrogen regulation of Hageman factor XII gene expression*. *Endocrinology*. 136 : p.5076-5083.
- Fejes-Toth G, Zahajszky T, Filep J. (1980) *Effect of vasopressin on renal kallikrein excretion*. *American Journal of Physiology*. 239 : p.F388-F392.
- Fields T, Ghebrehiwet B, Kaplan AP. (1983) *Kinin formation in hereditary angioedema plasma: evidence against kinin derivation from C2 and in support of "spontaneous" formation of bradykinin*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 72 : p.54-60.
- Figuroa CD, MacIver AG, Mackenzie JC, Bhoola KD. (1988) *Localisation of immunoreactive kininogen and tissue kallikrein in the human nephron*. *Histochemistry*. 89 : p.437-442.
- Figuroa CD, Henderson LM, Colman RW, De La Cadena RA, , Muller-Esterl W, Bhoola KD. (1990) *Immunoreactive L- and H-kininogen in human neutrophils*. *Journal of Physiology (London)*. 425 : 65P
- Fortin JP, Gera L, Bouthillier J, Stewart JM, Adam A, Marceau F. (2005) *Endogenous aminopeptidase N decreases the potency of peptide agonists and antagonists of the kinin B1 receptors in the rabbit aorta*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 314 : p.1169-1176.
- Fossum S, Hoem NO, Johannesen S, Korpberget M, Nylund E, Sandem S, Briseid K. (1994) *Contact factors in plasma from women on oral contraception--significance of factor XI for the measured activity of factor XII*. *Thrombosis Research*. 74 : p.477-485.
- Frey EK, Kraut H. (1926) *Über einen von der Niere ausgeschiedenen die Herztätigkeit anregenden Stoff*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*. 157 : p.32-61



Frey EK, Kraut H. (1928) *Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung*. Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie. 133 : p.1-56.

Frey EK, Kraut H, Werle E. (1950) *Kallikrein (Padutin)*. Enke, Stuttgart

Fukushima D, Kitamura N, Nakanishi S. (1985) *Nucleotide sequence of cloned cDNA for human pancreatic kallikrein*. Biochemistry. 24 : p.8037-8043.

Fuller PJ, Clements JA, Nikolaidis I, Hiwatari M, Funder JW. (1986) *Expression of the renal kallikrein gene in mineralocorticoid-treated and genetically hypertensive rats*. Journal of Hypertension. 4 : p.427-433.

Fuller PJ, Funder JW. (1986) *The cellular physiology of glandular kallikrein*. Kidney International. 29 : p.953-964.

Gafford JT, Skidgel RA, Erdös EG, Hersh LB. (1983) *Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides*. Biochemistry. 22 : p.3265-3271.

Gebhard W, Matthias S, Eulitz M. (1989) *cDNA cloning and complete structure of the small, active subunit of human carboxypeptidase N*. European Journal of Biochemistry. 178 : p.603-607.

Geha RS, Quinti I, Austen KF, Cicardi M, Sheffer A, Rosen FS. (1985) *Acquired C1-inhibitor deficiency associated with antiidiotypic antibody to monoclonal immunoglobulins*. New England Journal of Medicine. 312 : p.534-540.

Ghebrehwet B, Silverberg M, Kaplan AP. (1981) *Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment*. Journal of Experimental Medicine. 153 : p.665-676.

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. (2000) *Immunologie, Le cours de Janis Kuby*. 4<sup>ième</sup> édition. WH Freeman and Company, New York, New York and Basingstoke.

Goldsmith GH Jr, Saito H, Ratnoff OS. (1978) *The activation of plasminogen by Hageman factor (Factor XII) and Hageman factor fragments*. Journal of Clinical Investigation. 62 : p.54-60.

Gordon EM, Ratnoff OD, Saito H, Donaldson VH, Pensky J, Jones PK. (1980) *Rapid fibrinolysis, augmented Hageman factor (factor XII) titers, and decreased C1 esterase inhibitor titers in women taking oral contraceptives*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 96 : p.762-769.

Gordon EM, Williams SR, Frenckek B, Mazur CA, Speroff L. (1988) *Dose-dependent effects of postmenopausal estrogen and progestin on antithrombin III and factor XII*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 111 : p.52-56.

Graf K, Grafe M, Auch-Schwelk W, Baumgarten CR, Bossaller C, Fleck E. (1992) *Bradykinin degrading activity in cultured human endothelial cells*. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 20 : p.S16-S20.

Grouzmann E, Monod M, Landis B, Wilk S, Brakch N, Nicoucar K, Giger R, Malis D, Szalay-Quinodoz I, Cavadas C, Morel DR, Lacroix JS. (2002) *Loss of dipeptidylpeptidase IV activity in chronic rhinosinusitis contributes to the neurogenic inflammation induced by substance P in the nasal mucosa*. FASEB Journal. 16 : p.1132-1134.

Hagaman JR, Moyer JS, Bachman ES, Sibony M, Magyar PL, Welch JE, Smithies O, Krege JH, O'Brien DA. (1998) *Angiotensin-converting enzyme and male fertility*. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America. 95 : p.2552-2557.

Hanski C, Huhle T, Reutter W. (1985) *Involvement of plasma membrane dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated adhesion of cells on collagen*. Biological Chemistry Hoppe-Seyler. 366 : p.1169-1176.

Harpel PC, Cooper NR. (1975) *Studies on human plasma C1 inactivator-enzyme interactions. I. Mechanisms of interaction with C1s, plasmin, and trypsin.* The Journal of Clinical Investigation. 55 : p.593-604.

Harpel PC, Lewin MF, Kaplan AP. (1985) *Distribution of plasma kallikrein between C-1 inactivator and alpha 2-macroglobulin in plasma utilizing a new assay for alpha 2-macroglobulin-kallikrein complexes.* Journal of Biological Chemistry. 260 : p.4257-4263.

Hasan AA, Cines DB, Herwald H, Schmaier AH, Muller-Esterl W. (1995) *Mapping the cell binding site on high molecular weight kininogen domain 5.* Journal of Biological Chemistry. 270 : p.19256-19261.

Hauptmann G, Lang JM, North ML, Oberling F, Mayer G, Lachmann P. (1976) *Acquired c1-inhibitor deficiencies in lymphoproliferative diseases with serum immunoglobulin abnormalities. A study of three cases.* Blut. 32 : p.195-206.

Hauert J, Nicoloso G, Schleuning WD, Bachmann F, Schapira M. (1989) *Plasminogen activators in dextran sulfate-activated euglobulin fractions: a molecular analysis of factor XII- and prekallikrein-dependent fibrinolysis.* Blood. 73 : p.994-999.

He S, Sim RB, Whaley K. (1998) *Mechanism of action of anti-C1-inhibitor autoantibodies: prevention of the formation of stable C1s-C1-inh complexes.* Molecular Medicine. 4 : p.119-128.

Herrera C, Morimoto C, Blanco J, Mallol J, Arenzana F, Lluís C, Franco R. (2001) *Comodulation of CXCR4 and CD26 in human lymphocytes.* Journal of Biological Chemistry. 276 : p.19532-19539.

Herwald H, Hasan AA, Godovac-Zimmermann J, Schmaier AH, Muller-Esterl W. (1995) *Identification of an endothelial cell binding site on kininogen domain D3.* Journal of Biological Chemistry. 270 : p.14634-14642.

- Holdstock DJ, Mathias AP, Schachter M (1957) *A comparative study of kinin, kallidin, and bradykinin*. British Journal of Pharmacology. 12 : p.149-158
- Ichinose A, Fujikawa K, Suyama T. (1986) *The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin*. Journal of Biological Chemistry. 261 : p.3486-3489.
- Igic R, Sorrells K, Yeh HSJ, Erdös EG. (1972) *Identity of kininase II with angiotensin I converting enzyme*. In Vasopeptidases: Chemistry, Pharmacology and Pathophysiology, ed. by N. Back and F. Sicuteri, Plenum Press, New-York. p. 149-153.
- Inokushi J-Y, Nagamatsu A. (1981) *Tripeptidyl carboxypeptidase activity of kininase II (angiotensin-converting enzyme)*. Biochimica et Biophysica Acta. 662 : p.300-307.
- Ishii T, Ohnuma K, Murakami A, Takasawa N, Kobayashi S, Dang NH, Schlossman SF, Morimoto C. (2001) *CD26-mediated signaling for T cell activation occurs in lipid rafts through its association with CD45RO*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 98 : p.12138-12143.
- Israïli ZH, Hall WD. (1992) *Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology*. Annals of Internal Medicine. 117 : p.234-342.
- Jackson J, Sim RB, Whelan A, Feighery C. (1986) *An IgG autoantibody which inactivates C1-inhibitor*. Nature. 323 : p.722-724.
- Jackson J, Sim RB, Whaley K, Feighery C. (1989) *Autoantibody facilitated cleavage of C1-inhibitor in autoimmune angioedema*. Journal of Clinical Investigation. 83 : p.698-707.

Jaspard E, Alhenc-Gelas F. (1995) *Catalytic properties of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme on the cell surface*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 211 : p.528-534.

Jespersen J, Kluft C. (1985) *Increased euglobulin fibrinolytic potential in women on oral contraceptives low in oestrogen--levels of extrinsic and intrinsic plasminogen activators, prekallikrein, factor XII, and C1-inactivator*. Thrombosis and haemostasis. 54 : p.454-459.

Johnson AR, Ashton J, Schulz WW, Erdös EG. (1985) *Neutral metalloendopeptidase in human lung tissue and cultured cells*. American Review of Respiratory Disease. 132 : p.564-568.

Joseph K, Kaplan AP. (2005) *Formation of bradykinin: a major contributor to the innate inflammatory response*. Advances in Immunology. 86 : p.159-208.

Kaplan AP, Joseph K, Shibayama Y, Reddigari S, Ghebrehiwet B, Silverberg M. (1997) *The intrinsic coagulation/kinin-forming cascade: assembly in plasma and cell surfaces in inflammation*. Advances in Immunology. 66 : p.225-272.

Kaplan AP. (2001) *C1 inhibitor deficiency: hereditary and acquired forms*. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology. 11 : p.211-219.

Kaplan AP, Greaves MW. (2005) *Angioedema*. Journal of the American Academy of Dermatology. 53 : p.373-388

Kas K, Schoenmakers EF, Van de Ven WJ. (1995) *Physical map location of the human carboxypeptidase M gene (CPM) distal to D12S375 and proximal to D12S8 at chromosome 12q15*. Genomics. 30 (2) : p.403-405.

Kellermann J, Lottspeich F, Henschen A, Muller-Esterl W. (1986) *Completion of the primary structure of human high-molecular-mass kininogen. The amino acid sequence of the entire heavy chain and evidence for its evolution by gene triplication*. European Journal of Biochemistry. 154 : p.471-478.

Kemp A, Mellow L, Sabbadini E. (1986) *Inhibition of interleukin 1 activity by a factor in submandibular glands of rats*. The Journal of Immunology. 137 : p.2245-2251.

Kenny AJ, Stephenson LS, Turner AJ. ; Kenny AJ, Turner AJ, editors. (1987) *Mammalian ectoenzymes*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. Cell surface peptidases. 7 : p.169-210.

Kerr MA, Kenny AJ. (1974) *The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border*. Biochemical Journal. 137 : p.477-88.

Kleniewski J, Blankenship DT, Cardin AD, Donaldson V. (1992) *Mechanism of enhanced kinin release from high molecular weight kininogen by plasma kallikrein after its exposure to plasmin*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 120 : p.129-139.

Koch JH, Rowe J. (1976) *Immunosuppressive activity of submaxillary gland extracts of the mouse. I. Effect on antibody formation in response to sheep red blood cells*. European Journal of Immunology. 6: p.583-588.

Kongshavn PA, Bliss JQ. (1970) *Effect of mouse submandibular gland extracts on survival of H-2 incompatible skin allografts*. Immunology. 19 : p.363-367.

Kongshavn PA, Lapp WS. (1972) *Immunosuppressive effect of male mouse submandibular gland extracts on plaque-forming cells in mice: abolition by orchietomy*. Immunology. 22 : p.227-230.

Kraut H, Frey EK, Bauer E. (1928) *Über ein neues Kreislaufhormon*. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie. 175 : p.97-114.

Kraut H, Frey EK, Werle E. (1930) *Der Nachweis eines Kreislaufhormon in der Pankreasdrüse*. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie. 189 : p.97-106.

Kraut H, Frey EK, Werle E. (1933) *Über den Nachweis und das Vorkommen des Kallikreins im Blut*. Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie. 222 : p.73-98.

Lambeir AM, Durinx C, Scharpe S, De Meester I. (2003) *Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV*. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 40 : p.209-294.

Landerman NS, Webster ME, Becker EL, Ratcliffe HE (1962) *Hereditary angioneurotic edema. II. Deficiency of inhibitor for serum globulin permeability factor and/or plasma kallikrein*. The Journal of Allergy. 33 : p.330-341.

Larsen SL, Pedersen LO, Buus S, Stryhn A. (1996) *T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides*. Journal of Experimental Medicine. 184 : p.183-189.

Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. (2005) *International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences*. Pharmacological Reviews. 57 : p.27-77.

Lefebvre J, Murphey LJ, Hartert TV, Jiao Shan R, Simmons WH, Brown NJ. (2002) *Dipeptidyl peptidase IV activity in patients with ACE-inhibitor-associated angioedema*. Hypertension. 39 : p.460-464.

Lepow IH, Ratnoff OD, Rosen FS, Pillemer L. (1956) *Observations on a pro-esterase associated with partially purified first component of human complement (C'1)*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 92 : p.32-37.

Levin Y, Skidgel RA, Erdős EG. (1982) *Isolation and characterization of the subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase I)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 79 : p.4618-4622.

Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH, Peiper SC. (1989) *Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N*. Journal of Clinical Investigation. 83 : p.1299-1307.

Malbran A, Hammer CH, Frank MM, Fries LF. (1988) *Acquired angioedema: observations on the mechanism of action of autoantibodies directed against C1 esterase inhibitor*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 81 : p.1199-1204.

Mandle RJ Jr, Kaplan AP. (1979) *Hageman-factor-dependent fibrinolysis: generation of fibrinolytic activity by the interaction of human activated factor XI and plasminogen*. Blood. 54 : p.850-862.

Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. (1998) *The B1 receptors for kinins*. Pharmacological Reviews. 1998 Sep;50(3):357-86.

Marceau F, Sabourin T, Houle S, Fortin JP, Petitclerc E, Molinaro G, Adam A. (2002) *Kinin receptors: functional aspects*. International Immunopharmacology. 2 : p.1729-1739.

Marcondes S, Antunes E. (2005) *The plasma and tissue kininogen-kallikrein-kinin system: role in the cardiovascular system*. Current medicinal chemistry. Cardiovascular and hematological agents. 3 : p.33-44.

Margolius HS, Horwitz D, Pisano JJ, Keiser HR. (1974) *Urinary kallikrein excretion in hypertensive man. Relationships to sodium intake and sodium-retaining steroids*. Circulation Research. 35 : p.820-825.

Margolius HS. (1996) *Kallikreins and kinins. Molecular characteristics and cellular and tissue responses*. Diabetes. 45 : S14-S19.

Mason AJ, Evans BA, Cox DR, Shine J, Richards RI. (1983) *Structure of mouse kallikrein gene family suggests a role in specific processing of biologically active peptides*. Nature. 303: p.300-307.



McGiff JC, Terragno NA, Malik KU, Lonigro AJ. (1972) *Release of a prostaglandin E-like substance from canine kidney by bradykinin*. Circulation Research. 31 : p.36-43.

Melamed J, Alper CA, Cicardi M, Rosen FS. (1986) *The metabolism of C1 inhibitor and C1q in patients with acquired C1-inhibitor deficiency*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 77 : p.322-326.

Mentlein R, Roos T. (1996) *Proteases involved in the metabolism of angiotensin II, bradykinin, calcitonin gene-related peptide (CGRP), and neuropeptide Y by vascular smooth muscle cells*. Peptides. 17 : p.709-720.

Merlini PA, Cugno M, Rossi ML, Agricola P, Repetto A, Fetiveau R, Diotallevi P, Canosi U, Mannucci PM, Ardissino D. (2004) *Activation of the contact system and inflammation after thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction*. American Journal of Cardiology. 93 : p.822-825.

Miles LA, Burnier JP, Verlander MS, Goodman M, Kleiss AJ, Griffin JH. (1981) *Inactivation of purified human alpha 2-antiplasmin and purified human C1 inhibitor by synthetic fibrinolytic agents*. Blood. 57 : p.1015-1024.

Miles LA, Greengard JS, Griffin JH. (1983) *A comparison of the abilities of plasma kallikrein, beta-Factor XIIa, Factor XIa and urokinase to activate plasminogen*. Thrombosis Research. 29 : p.407-417.

Miller DH, Chao J, Margolius HS. (1984) *Tissue kallikrein synthesis and its modification by testosterone or low dietary sodium*. Biochemical Journal. 218 : p.37-43.

Miller DH, Lindley JG, Margolius HS. (1985) *Tissue kallikrein levels and synthesis rates are not changed by an acute physiological dose of aldosterone*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 180 : p.121-125.

Milton IL. (1876) *On giant urticaria*. Edinburgh Medical Journal. 22 : p.513-526.

Molinaro G, Rouleau JL, Adam A. (2002a) *Vasopeptidase inhibitors: a new class of dual zinc metallopeptidase inhibitors for cardiorenal therapeutics*. Current Opinion in Pharmacology. 2 : p.131-141.

Molinaro G, Cugno M, Perez M, Lepage Y, Gervais N, Agostoni A, Adam A. (2002b) *Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema is characterized by a slower degradation of des-arginine(9)-bradykinin*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 303 : p.232-237.

Molinaro G, Adam A, Lepage Y, Hammerschmidt D, Koenigbauer U, Eastlund T. (2002c) *Hypotensive reaction during staphylococcal protein A column therapy in a patient with anomalous degradation of bradykinin and Des-Arg9-bradykinin after contact activation*. Transfusion. 42 : p.1458-1465.

Molinaro G, Boileau G, Adam A. (2004) *Aminopeptidase P and vasoactive peptides: from fundamental aspects to clinical interests*. In: Aminopeptidases in Biology and Disease. Editor: Hooper and Lendeckel, Kluwer Academic/Plenum Publishers, London. Chapter 12 : p.251-269.

Molinaro G, Carmona AK, Juliano MA, Juliano L, Malitskaya E, Yessine MA, Chagnon M, Lepage Y, Simmons WH, Boileau G, Adam A. (2005) *Human recombinant membrane-bound aminopeptidase P: production of a soluble form and characterization using novel, internally quenched fluorescent substrates*. Biochemical Journal. 385 : p.389-397.

Moore JW, Pearson RG. (1981) *Kinetics and mechanisms*. New-York: Wiley: p.284-296.

Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. (2005a) *The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets*. Journal of Pharmacological Sciences. 99 : p.6-38.

Moreau ME, Dubreuil P, Molinaro G, Chagnon M, Muller-Esterl W, Lepage Y, Marceau F, Adam A. (2005b) *Expression of metallopeptidases and kinin receptors in swine oropharyngeal tissues: effects of ACE inhibition and inflammation*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 315 : p.1065-1074.

Motta G, Rojkaer R, Hasan AA, Cines DB, Schmaier AH. (1998) *High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: a novel mechanism for contact activation*. Blood. 91 : p.516-528.

Müller-Esterl W, Iwanaga S, Nakanishi S. (1986) *Kininogens revisited*. Trends in Biochemical Sciences. 11 : p.336-339.

Mutt V, Said SI. (1974) *Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide. The amino-acid sequence. Use of kallikrein in its determination*. European Journal of Biochemistry. 42 : p.581-589.

Nagy E, Berczi I, Sabbadini E. (1997) *Immunoregulatory effects of glandular kallikrein from the salivary submandibular gland of rats*. Neuroimmunomodulation. 4 : p.107-112.

Nasjletti A, Colina-Chourio J, McGiff JC. (1975) *Disappearance of bradykinin in the renal circulation of dogs. Effects of kininase inhibition*. Circulation Research. 37: p.59-65.

Neurath H, Walsh KA, Winter WP. (1967) *Evolution of structure and function of proteases*. Science. 158 : p.1638-1644.

Nilsson T, Back O. (1985) *Elevated plasmin-alpha 2-antiplasmin complex levels in hereditary angioedema: evidence for the in vivo efficiency of the intrinsic fibrinolytic system*. Thrombosis Research. 40 : p.817-821.

Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. (1998) *Plasma bradykinin in angio-oedema*. Lancet. 351 : p.1693-1697.

Ogata H, Ura N, Shimamoto K, Sakakibara T, Ando T, Nishimiya T, Nakagawa M, Fukuyama S, Masuda A, Yamaguchi Y, Ise T, Saito S, Shiiki M, Uno K, Iimura O. (1989) *A sensitive method for differential determination of kininase I, II and neutral endopeptidase (NEP) in human urine*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 247B : p.343-348.

Okamoto H, Greenbaum LM. (1983) *Isolation and structure of T-kinin*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 112 : p.701-708.

Ole-Moiyoi O, Seldin DC, Spragg J, Pinkus G, Austen KF. (1979) *Sequential cleavage of pro-insulin by human pancreatic kallikrein and a human pancreatic kinase*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76 : p.3612-3616.

Orstavik TB, Carretero OA, Scicli AG. (1982) *Kallikrein-kinin system in regulation of submandibular gland blood flow*. *Advances in Physiology Education*. 242 : p.1010-1014.

Oshima G, Hiraga Y, Shirono K, Oh-ishi S, Sakakibara S, Kinoshita T. (1985) *Cleavage of des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin by angiotensin I-converting enzyme from pig kidney cortex*. *Experientia*. 41 : p.325-328.

Osler W. (1888) *Hereditary angio-neurotic edema*. *American Journal of the Medical Sciences*. 95 : p.362-367.

Page IH, Helmer OM. (1940) *Crystalline pressor substance, angiotonin resulting from the reaction between renin and renin activator*. *The Journal of Experimental Medicine*. 71 : p.29-42.

Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. (1980) *A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients*. *Cancer Research*. 40 : p.2428-2432.

Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W, Ruoslahti E. (2000) *Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis*. *Cancer Research*. 60 : p.722-727.

Pelorosso FG, Brodsky PT, Zold CL, Rothlin RP. (2005) *Potentiation of des-Arg9-kallidin-induced vasoconstrictor responses by metallopeptidase inhibition in isolated human umbilical artery*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 313 : p.1355-1360.

Penschow JD, Drinkwater CC, Haralambidis J, Coghlan JP. (1991) *Sites of expression and induction of glandular kallikrein gene expression in mice*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 81 : p.135-146.

Pesquero JB, Jubilot GN, Lindsey CJ, Paiva AC. (1992) *Bradykinin metabolism pathway in the rat pulmonary circulation*. *Journal of Hypertension*. 10 : p.1471-1478.

Pfaffl MW (2001) *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Research*. 29 : p.e45.

Plummer TH Jr, Hurwitz MY. (1978) *Human plasma carboxypeptidase N. Isolation and characterization*. *Journal of Biological Chemistry*. 253 : p.3907-3912.

Prechel MM, Orawski AT, Maggiora LL, Simmons WH. (1995) *Effect of a new aminopeptidase P inhibitor, apstatin, on bradykinin degradation in the rat lung*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 275 : p.1136-1142.

Pritchett DB, Roberts JL. (1987) *Dopamine regulates expression of the glandular-type kallikrein gene at the transcriptional level in the pituitary*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. 84 : p.5545-5549.

Qin H, Kemp J, Yip MY, Lam-Po-Tang PR, Morris BJ. (1991) *Localization of human glandular kallikrein-1 gene to chromosome 19q13.3-13.4 by in situ hybridization*. Human Heredity. 41 : p.222-226.

Quincke HI. (1882) *U"ber akutes umschriebenes Hauto"dem* [About an acute described skin edema]. Monatshe Prakt Dermatol. 1 : p.129-131.

Rawlings ND, Barrett AJ. (1993) *Evolutionary families of peptidases*. Biochemical Journal. 290 : p.205-218.

Raymond P, Drapeau G, Raut R, Audet R, Marceau F, Ong H, Adam A. (1995) *Quantification of Des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin using a chemiluminescence enzyme immunoassay: application to its kinetic profile during plasma activation*. Journal of Immunological Methods. 180 : p.247-257.

Regoli D, Barabé J, Park WK. (1977) *Receptors for bradykinin in rabbit aorta*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 55 : p.855-867.

Regoli D, Barabé J. (1980) *Pharmacology of bradykinin and related kinins*. Pharmacological Reviews. 32 : p.1-46.

Richards RI, Holman K, Shen Y, Kozman H, Harley H, Brook D, Shaw D. (1991) *Human glandular Kallikrein genes: genetic and physical mapping of the KLK1 locus using a highly polymorphic microsatellite PCR marker*. Genomics. 11 : p.77-82.

Riegman PH, Vlietstra RJ, Klaassen P, van der Korput JA, Geurts van Kessel A, Romijn JC, Trapman J. (1989) *The prostate-specific antigen gene and the human glandular kallikrein-1 gene are tandemly located on chromosome 19*. FEBS Letters. 247 : p.123-126.

Riegman PH, Vlietstra RJ, Suurmeijer L, Cleutjens CB, Trapman J. (1992) *Characterization of the human kallikrein locus*. Genomics. 14 : p.6-11.

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. (1990) *An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels.* Journal of Clinical Investigation. 86 : p.1343-1346.

Rittenhouse HG, Finlay JA, Mikolajczyk SD, Partin AW. (1998) *Human Kallikrein 2 (hK2) and prostate-specific antigen (PSA): two closely related, but distinct, kallikreins in the prostate.* Critical Reviews in Clinical Laboratory. 35 : p.275-368.

Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. (1949) *Bradykinin, a hypotensive and a smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venom and by trypsin.* American Journal Physiology. 156 : p.261-273.

Rockel A, Brand A, Zenglein H, Heidland A. (1985) *Parotid kallikrein secretion in the rat after alterations of electrolyte transport and cAMP activity.* Mineral and Electrolyte Metabolism. 11 : p.14-18.

Roy P, Chatellard C, Lemay G, Crine P, Boileau G. (1993) *Transformation of the signal peptide/membrane anchor domain of a type II transmembrane protein into a cleavable signal peptide.* Journal of Biological Chemistry. 268 : p.2699-2704.

Ryan JW, Roblero J, Stewart JM. (1968) *Inactivation of bradykinin in the pulmonary circulation.* Biochemical Journal. 110 : p.795-797.

Saiki I, Fujii H, Yoneda J, Abe F, Nakajima M, Tsuruo T, Azuma I. (1993) *Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation.* International Journal of Cancer. 1993 Apr 22;54(1):137-43.

Saito M, Majima M, Katori M, Sanjou Y, Suyama I, Shiokawa H, Koshiba K, Aoyagi T. (1995) *Degradation of bradykinin in human urine by carboxypeptidase Y-like exopeptidase and neutral endopeptidase and their inhibition by ebelactone B and phosphoramidon.* International Journal of Tissue Reactions. 17 : p.181-190.

Salvesen G, Parkes C, Abrahamson M, Grubb A, Barrett AJ. (1986) *Human low-Mr kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases*. *Biochemical Journal*. 234 : p.429-434.

Schachter M, Thain EM. (1954) *Chemical and pharmacological properties of the potent, slow contracting substance (kinin) in wasp venom*. *British Journal of Pharmacology*. 9 : p.352-359.

Schachter M. (1956) *A delayed slow contracting effect of serum and plasma due to the release of a substance resembling kallidine and bradykinin*. *British Journal of Pharmacology*. 11 : p.111-118.

Schachter M. (1960) *Some properties of kallidine, bradykinin and wasp venom kinin*. In *Polypeptides Which Affect Smooth Muscles and Blood Vessels*, ed. by M Schachter, p.232-246, Pergamon Press, Oxford, New York.

Schachter M. (1969) *Kallikreins and kinins*. *Physiological Reviews*. 49 : p.519-547.

Schachter M. (1980) *Kallikreins (kininogenases): a group of serine proteases with bioregulatory actions*. *Pharmacological Reviews*. 31 : p.1-17.

Schapira M, Silver LD, Scott CF, Schmaier AH, Prograis LJ Jr, Curd JG, Colman RW. (1983) *Prekallikrein activation and high-molecular-weight kininogen consumption in hereditary angioedema*. *New England Journal of Medicine*. 308 : p.1050-1053.

Schmaier AH, Smith PM, Purdon AD, White JG, Colman RW. (1986) *High molecular weight kininogen: localization in the unstimulated and activated platelet and activation by a platelet calpain(s)*. *Blood*. 67 : p.119-130.

Schrader WP, West CA, Miczek AD, Norton EK. (1990) *Characterization of the adenosine deaminase-adenosine deaminase complexing protein binding reaction*. *Journal of Biological Chemistry*. 265 : p.19312-19318.



Schreiber AD, Zweiman B, Atkins P, Goldwein F, Pietra G, Atkinson B, Abdou NI. (1976) *Acquired angioedema with lymphoproliferative disorder: association of C1 inhibitor deficiency with cellular abnormality*. Blood. 48 : p.567-580.

Sigler C, Annis K, Cooper K, Haber H, Van deCarr S. (1997) *Examination of baseline levels of carboxypeptidase N and complement components as potential predictors of angioedema associated with the use of an angiotensin-converting enzyme inhibitor*. Archives of Dermatology. 133 : p.972-975.

Skeggs LT Jr, Kahn JR, Shumway NP. (1956) *The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme*. Journal of Experimental Medecine. 103 : p.295-299.

Skidgel RA, Johnson AR, Erdös EG. (1984) *Hydrolysis of opioid hexapeptides by carboxypeptidase N. Presence of carboxypeptidase in cell membranes*. Biochemical Pharmacology. 33 : p.3471-3478.

Skidgel RA. (1988) *Basic carboxypeptidases: regulators of peptide hormone activity*. Trends in Pharmacological Sciences. 9 : p.299-304.

Skidgel RA. (1995) *Human carboxypeptidase N: lysine carboxypeptidase*. Methods in Enzymology. 248 : p.653-663.

Slim R, Torremocha F, Moreau T, Pizard A, Hunt SC, Vuagnat A, Williams GH, Gauthier F, Jeunemaitre X, Alhenc-Gelas F. (2002) *Loss-of-function polymorphism of the human kallikrein gene with reduced urinary kallikrein activity*. Journal of the American Society of Nephrology. 13 : p.968-976.

Soderberg C, Giugni TD, Zaia JA, Larsson S, Wahlberg JM, Moller E. (1993) *CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection*. Journal of Virology. 67 : p.6576-6585.

Song Q, Chao J, Chao L. (1997) *DNA polymorphisms in the 5'-flanking region of the human tissue kallikrein gene*. Human Genetics. 99 : p.727-734.

Sprinkle TJ, Stone AA, Venema RC, Denslow ND, Caldwell C, Ryan JW. (1998) *Assignment of the membrane-bound human aminopeptidase P gene (XPNPEP2) to chromosome Xq25*. Genomics. 50 : p.114-116.

Sprinkle TJ, Caldwell C, Ryan JW. (2000) *Cloning, chromosomal sublocalization of the human soluble aminopeptidase P gene (XPNPEP1) to 10q25.3 and conservation of the putative proton shuttle and metal ligand binding sites with XPNPEP2*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 378 : 51-56.

Tan F, Weerasinghe DK, Skidgel RA, Tamei H, Kaul RK, Roninson IB, Schilling JW, Erdős EG. (1990) *The deduced protein sequence of the human carboxypeptidase N high molecular weight subunit reveals the presence of leucine-rich tandem repeats*. The Journal of Biological Chemistry. 265 : p.13-19.

Tanaka T, Camerini D, Seed B. (1992) *Cloning and functional expression of the T cell activation of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene*. Journal of Immunology. 149 : p.481-486.

Tanaka T, Duke-Cohan JS, Kameoka J, Yaron A, Lee I, Schlossman SF, Morimoto C. (1994) *Enhancement of antigen-induced T-cell proliferation by soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 91 : p.3082-3086.

Thompson RE, Mandle R Jr, Kaplan AP. (1977) *Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma*. Journal of Clinical Investigation. 60 : p.1376-1380.

Turner AJ, Hooper NM. (2002) *The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology*. Trends in Pharmacological Sciences. 23 : p.177-183.

Ura N, Shimamoto K, Nakao T, Ogasawara A, Tanaka S, Mita T, Nishimiya T, Iimura O. (1983) *The excretion of human urinary kallikrein quantity and activity in normal and low renin subgroups of essential hypertension*. Clinical and Experimental Hypertension Part A. 5 : p.329-337.

Vaghy PL, Russell JS, Lantry LE, Stephens RE, Ward PE. (1995) *Angiotensin and bradykinin metabolism by peptidases identified in cultured human skeletal muscle myocytes and fibroblasts*. Peptides. 16 : p.1367-1373

Valenzuela A, Blanco J, Callebaut C, Jacotot E, Lluís C, Hovanessian AG, Franco R. (1997) *Adenosine deaminase binding to human CD26 is inhibited by HIV-1 envelope glycoprotein gp120 and viral particles*. Journal of Immunology. 158 : p.3721-3729.

van der Graaf F, Koedam JA, Bouma BN. (1983) *Inactivation of kallikrein in human plasma*. Journal of Clinical Investigation. 71 : p.149-158.

van Iwaarden F, de Groot PG, Bouma BN. (1988a) *The binding of high molecular weight kininogen to cultured human endothelial cells*. Journal of Biological Chemistry. 263 : p.4698-4703.

van Iwaarden F, de Groot PG, Sixma JJ, Berrettini M, Bouma BN. (1988b) *High-molecular weight kininogen is present in cultured human endothelial cells: localization, isolation, and characterization*. Blood. 71 : p.1268-1276.

Van Leeuwen BH, Evans BA, Tregear GW, Richards RI. (1986) *Mouse glandular kallikrein genes. Identification, structure, and expression of the renal kallikrein gene*. Journal of Biological Chemistry. 261: p.5529-5535.

Van Leeuwen BH, Penschow JD, Coghlan JP, Richards RI. (1987) *Cellular basis for the differential response of mouse kallikrein genes to hormonal induction*. EMBO Journal. 6: p.1705-1713

Velarde V, Ullian ME, Morinelli TA, Mayfield RK, Jaffa AA. (1999) *Mechanisms of MAPK activation by bradykinin in vascular smooth muscle cells*. American Journal of Physiology. 277 : p.C253-C261.

Venema RC. (2002) *Post-translational mechanisms of endothelial nitric oxide synthase regulation by bradykinin*. International Immunopharmacology. 2 : p.1755-1762.

Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. (2002) *Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2)*. Journal of Biological Chemistry. 277 : p.14838-14843.

Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. (1977) *Tissue specific and tumor specific antigens in human prostate*. Federation Proceedings. 36 : p.1254

Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. (1979) *Purification of a human prostate specific antigen*. Investigative Urology. 17 : p.159-163.

Wang MC, Papsidero LD, Kuriyama M, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. (1981) *Prostate antigen: a new potential marker for prostatic cancer*. Prostate. 2 : p.89-96.

Ward PE, Benter IF, Dick L, Wilk S. (1990) *Metabolism of vasoactive peptides by plasma and purified renal aminopeptidase M*. Biochemical Pharmacology. 40 : p.1725-1732.

Watt VM, Willard HF. (1990) *The human aminopeptidase N gene: isolation, chromosome localization, and DNA polymorphism analysis*. Human Genetics. 85 : p.651-654.

Wei L, Alhenc-Gelas F, Soubrier F, Michaud A, Corvol P, Clauser E. (1991) *Expression and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme. Evidence for a C-terminal transmembrane anchor and for a proteolytic processing of the secreted recombinant and plasma enzymes*. Journal of Biological Chemistry. 266 : p.5540-5546.

Werle E. (1936) *Über Kallikrein aus Blut*. Biochemische Zeitschrift. 287 : p.235-261.

Werle E, Götze W, Keppler A. (1937) Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue darmkontrahierende. Substanz. *Biochemische Zeitschrift*. 289 : p.217-233.

Werle E, Grunz M. (1939) *Zur Kenntnis der darmkontrahierenden, uterus erregenden und blutdrucksenkenden Substanz DK*. *Biochemische Zeitschrift*. 301 : p.429 – 436.

Werle E, Berek U. (1948) *Zur Kenntnis des kallikreins*. *Angewandte Chemie*. 60A : p.53.

Werle E. (1960) *Kallikrein, kallidine and related substances*. . In *Polypeptides Which Affect Smooth Muscles and Blood Vessels*, ed. by M Schachter, p.199-209, Pergamon Press, Oxford.

Werle E. (1970) *Discovery of the most important kallikreins and kallikrein inhibitors*. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol XXV, Bradykinin, Kallidin and Kallikrein, ed. by E.G. Erdös and A.F. Wilde, p.1-6.

Wu Q, Kuo HC, Deng GG. (2005) *Serine proteases and cardiac function*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1751 : p.82-94.

Yang HY, Erdös EG, Levin Y. (1970) *A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 214 : p.374-376.

Yang HY, Erdös EG, Levin Y. (1971) *Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin I converting enzyme)*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 177 : p.291-300.

Yousef GM, Diamandis EP. (2001) *The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease*. *Endocrine Reviews*. 22 : p.184-204.

Yousef GM, Obiezu CV, Luo LY, Magklara A, Borgono CA, Kishi T, Memari N, Michael P, Sidiropoulos M, Kurlender L, Economopolou K, Kapadia C, Komatsu N, Petraki C, Elliott M, Scorilas A, Katsaros D, Levesque MA, Diamandis EP. (2005) *Human tissue kallikreins: from gene structure to function and clinical applications*. *Advances in Clinical Chemistry*. 39 : p.11-79.

Yu H, Song Q, Freedman BI, Chao J, Chao L, Rich SS, Bowden DW. (2002) *Association of the tissue kallikrein gene promoter with ESRD and hypertension*. *Kidney International*. 61 : p.1030-1039.

Zhao Y, Qiu Q, Mahdi F, Shariat-Madar Z, Rojkaer R, Schmaier AH. (2001) *Assembly and activation of HK-PK complex on endothelial cells results in bradykinin liberation and NO formation*. *American Journal of Physiology. Heart and Circulation Physiology*. 280 : p.H1821-H1829.

Zhou GX, Chao L, Chao J. (1992) *Kallistatin: a novel human tissue kallikrein inhibitor. Purification, characterization, and reactive center sequence*. *Journal of Biological Chemistry*. 267 : p.25873-25880.

Zinner SH, Margolius HS, Rosner B, Keiser HR, Kass EH. (1976) *Familial aggregation of urinary kallikrein concentration in childhood: relation to blood pressure, race and urinary electrolytes*. *American Journal of Epidemiology*. 104 : p.124-132.

Zinner SH, Margolius HS, Rosner B, Kass EH. (1978) *Stability of blood pressure rank and urinary kallikrein concentration in childhood: an eight-year follow-up*. *Circulation*. 58 : p.908-915.

